

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 101 23 055.9

**Anmeldetag:** 11. Mai 2001

**Anmelder/Inhaber:** Grünenthal GmbH,  
Aachen/DE

**Bezeichnung:** Screeningverfahren mit PIM1-Kinase  
oder PIM3-Kinase

**IPC:** C 12 Q, C 12 N, A 01 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 04. September 2003  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: Eberhard WEIHE et al  
Serial No.: not yet assigned  
Filed: November 12, 2003  
Title: SCREENING METHOD USING PIM1-KINASE OR PIM3-KINASE

CLAIM OF CONVENTION PRIORITY

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Priority is hereby claimed based on the following foreign patent application:

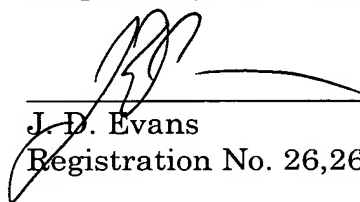
Fed. Rep. of Germany  
Application No. 101 23 055.9,  
filed May 11, 2001,

and it is respectfully requested that the instant application be accorded the benefit of the filing date of said foreign application pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119.

In support of this claim, a duly certified copy of said foreign application is submitted herewith.

Respectfully submitted,

November 12, 2003

  
\_\_\_\_\_  
J.D. Evans  
Registration No. 26,269

CROWELL & MORING, LLP  
P.O. Box 14300  
Washington, DC 20044-4300  
Telephone No.: (202) 624-2500  
Facsimile No.: (202) 628-8844  
JDE:dcb

**Patentanmeldung der Grünenthal GmbH, D-52078 Aachen**  
**(eigenes Zeichen: G 3064)**

**Screeningverfahren mit PIM1-Kinase oder PIM3-Kinase**

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Auffindung schmerzrelevanter Substanzen unter Verwendung der PIM-1- oder PIM-3-Kinase und die Verwendung dadurch identifizierter Verbindungen sowie Antikörper und Antisensenukleotiden gegen PIM-1- oder PIM-3-Kinase in Arzneimitteln und Diagnostika sowie in der Schmerztherapie.

10

Zur Therapie von Schmerzen stehen unterschiedliche Arzneimittel zur Verfügung wie z.B. Acetylsalicylsäure, Paracetamol, Dipyrone, Tramadol, Morphin und Fentanyl; aber auch Substanzen wie Amitryptilin und Ketamin kommen zur Behandlung von Schmerzpatienten zum Einsatz. Trotz

15 zunehmend verfeinerter Therapieschemata kann jedoch insbesondere bei chronischen Schmerzzuständen oft keine dauerhafte Verbesserung für die Patienten erzielt werden. Hierfür ist unter anderem auch die Tatsache verantwortlich, daß es beim chronischen Schmerz zu dauerhaften

20 Veränderungen beteiligter Nervenzellen kommt.

20

25

Die Schmerzforschung der letzten Jahre erbrachte die grundlegende Erkenntnis, daß der Entwicklung gerade chronischer Schmerzzustände plastische Veränderungen des Nervensystems, insbesondere in den nozizeptiven Neuronen der Hinterwurzelganglien und der Neurone im Bereich der Dorsalhörner des Rückenmarks, zugrunde liegen (als Überblick siehe: Coderre et al. 1993; Zimmermann & Herdegen, 1996). Die neuronale Plastizität geht einher mit Veränderungen in der Expression bestimmter Gene und führt zur langanhaltenden Veränderung des Phänotyps der betroffenen Neuronen. Das Konzept der neuronalen Plastizität wurde

30 bisher vor allem auf Entwicklungs-, Lern- und Regenerationsprozesse angewandt, doch die neueren Befunde aus der Schmerzforschung zeigen,

30

daß dieses Konzept auch bei pathophysiologischen Vorgängen greift (Tölle, 1997).

Die Chronifizierung des Schmerzes ist tierexperimentell auf phänomenologischer Ebene bereits relativ gut charakterisiert. Die Induktion chronischer Schmerzzustände führt zu folgenden Veränderungen:

- Erhöhte Empfindlichkeit und verringerte Reizschwelle peripherer Nozizeptoren
- Aktivierung sogenannter stiller Nozizeptoren
- Reorganisation rezeptiver Felder
- Erregbarkeitszunahme im Rückenmark.

Diese plastischen Veränderungen sind sowohl für die in den Ganglien vorkommenden primären Afferenzen, als auch für die im Rückenmark lokalisierten nachgeschalteten Neurone beschrieben worden und werden auch supraspinal z. B. im Thalamus vermutet. In Analogie zu den für Lern- und Gedächtnisprozesse beschriebenen Mechanismen ist anzunehmen, daß in den beteiligten Zellen ein spezifisches Genprogramm abläuft, das die koordinierte Regulation relevanter Gene beinhaltet, deren Expression dann maßgeblich zur pathophysiologischen Ausprägung chronischer Schmerzen beiträgt.

Ausgangspunkt der Erfindung war daher die Identifizierung derartiger schmerzregulierter, die in ihrer Expression unter Schmerzbedingungen verändert und deshalb wahrscheinlich an der Entstehung und Verarbeitung von insbesondere chronischen Schmerzen beteiligt sind, über ihre Regulationszusammenhänge.

Für eine Reihe bekannter Gene wurde bereits eine Regulation in

verschiedenen Schmerzmodellen nachgewiesen (s. Tabelle 1), so zum Beispiel für Neurotransmitter (Substanz P, CGRP), Rezeptoren (Substanz P-Rezeptor,  $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\delta$ -Opiatrezeptoren, NMDA-Rezeptor) und Transkriptionsfaktoren (cJun, JunB, cFos oder Krox24). Die Tatsache, daß die genannten Rezeptoren bereits als molekulare Targets für die Entwicklung neuer Analgetika verwendet werden (Dickenson, 1995), gibt einen deutlichen Hinweis darauf, daß auch die Identifizierung neuer schmerzregulierter Gene für die Entwicklung von Analgetika, insbesondere für entsprechende Screeningverfahren, von großem Interesse ist. Die zentrale Idee ist hierbei, die Entstehung oder Persistenz von Schmerzen, insbesondere chronischer Art, zu unterbrechen, indem solche Proteine in ihrer Funktion beeinflusst werden, die in Schmerz-Zuständen verstärkt oder vermindert gebildet werden.

Tabelle 1: Regulation bekannter Gene/Genprodukte in Schmerz-Tiermodellen

Gen(pr dukt)	Reg	Geweb /Zelle	M dell	Literatur
<b>(a) Neurotransmitter</b>				
CGRP	↑↑	RM-Dorsalhorn	UV-Bestrahlung der Haut	Gillardon F et al. (1992) Ann NY Acad Sci 657: 493-96
Preprotachykinin & CGRP-mRNA	↑↑	DRG	Monoarthritis	Donaldson LF et al. (1992) Mol Brain Res 16: 143-49
Preprotachykinin -mRNA	↑↑	RM-Dorsalhorn	Formalin	Noguchi & Ruda (1992) J Neurosci 12:2563-72
Prodynorphin mRNA	↑↑	Rückenmark	Exp Arthritis	Höhl et al (1987) Neurosci Lett 96:247-52
Dynorphin Prot.	↑↑	Rückenmark	Formalin	Ruda et al. (1988) PNAS 85: 622-26
Substanz P	↑↑	Nozizeptoren	Exp. Arthritis	Levine JD et al. (1984) Science 226:547-49
<b>(b) Neurotrophine</b>				
BDNF mRNA & Immunreaktivität	↑↑	DRG: trkA+ Zellen	i. th. NGF Inj.	Michael GC et al. (1997) J Neurosci 17: 8476-90
<b>(c) Rezeptoren</b>				
μ, κ, δ-Bindung	↓↑	RM-Dorsalhorn	Monoarthritis	Besse D et al. (1992) Eur J Pharmacol 223:123-31
μ-Opiatrezeptor-Immunreaktivität	↑↑	DRG	Carageenan ind. Entzündung	Ji R-R et al. (1995) J Neurosci 15: 8156-66
κ & δ-Opiatrez.-mRNA	↓	DRG	Carageenan ind. Entzündung	Ji R-R et al. (1995) J Neurosci 15: 8156-66
κ & μ-Opiatrezeptor-mRNA	↑↑	RM-Dorsalhorn	Monoarthritis	Maekawa K et al. (1995) Pain 64:365-71
CCK <sub>8</sub> -Rez. mRNA	↑↑	DRG	Axotomie	Zhang X et al. (1993) Neuroscience 57: 227-233
NMDA-R1-mRNA	↓	RM-Dorsalhorn Laminae I & II	CFA-induzierte Entzündung	Kus L et al. (1995) Neuroscience 68: 159-65
<b>(d) Enzyme</b>				
NADPH-Diaphorase Aktivität	↑↑	RM-Dorsalhorn	Ischiaticus-Transection	Fiallos-Estrada et al. ('93) Neurosci Lett 150: 169-73
NADPH-Diaphorase	↑↑	Rückenmark	Formalin	Solodkin et al. 1992 Neurosci 51: 495-99
NO-Synthetase mRNA	↑↑	DRG	Axotomie	Verge VMK et al. (1992) PNAS 89: 11617-62
NO-Synthetase Protein	↑↑	RM-Dorsalhorn	Formalin	Herdegen et al. (1994) Mol Brain Res 22:245-58
NO-Synthetase-Immunreaktivität	↑↑	DRG	Ischiaticus-Transection	Fiallos-Estrada et al. ('93) Neurosci Lett 150: 169-73
<b>(e) Signalkaskade</b>				
rap1A, rap1B, H-ras mRNA	↑↑	Rückenmark	Formalin	Urayama O et al. (1997) Mol Brain Res 45:331-34
PKC-Bindung	↑↑	RM-Dorsalhorn	CFA-induzierte Monoarthritis	Tölle TR et al (82) J Neurol 242(S2):135
<b>(f) Transkriptionsf.</b>				
cFOS	↑↑	Rückenmark	Noxische Stimulierung	Hunt SP et al. (1987) Nature 328: 632-34
cJun, JunB, cFOS	↑↑	RM-Dorsalhorn	Formalin	Herdegen T et al. (1994) Mol Brain Res 22: 245-48
Krox24				

RM, Rückenmark; DRG, Dorsal Root Ganglia; CFA, Complete Freund Adjuvans; NGF, Nerve Growth Factor.

Daraus folgend war primäre Aufgabe der Erfindung, ein Screeningverfahren zur Identifizierung im Schmerz relevanter, insbesondere schmerzregulierender Substanzen zu entwickeln. Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Auffindung schmerzregulierender Substanzen mit folgenden Verfahrensschritten:

(a) Inkubation einer zu testenden Substanz unter geeigneten Bedingungen mit einer Zelle und/oder einer Präparation aus einer solchen Zelle, die das Protein PIM-1-Kinase oder PIM-2-Kinase und/oder ein Protein gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b), 2d) oder 2f) und/oder ein zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Protein und/oder ein Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder ein Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder deren Antisense Polynukleotide binden, oder ein mindestens 10 Aminosäuren langes Teilprotein eines der vorgenannten Proteine synthetisiert hat,

(b) Messung der Bindung der Testsubstanz an dem von der Zelle synthetisierten Protein oder Teilprotein oder Messung mindestens eines der durch die Bindung der Testsubstanz an das Protein oder Teilprotein veränderten funktionellen Parameter.

Dieses neuartige Screeningverfahren basiert darauf, daß hier eine potentielle Schmerz-Wirksamkeit einer Substanz über ihre Wechselwirkung mit einer schmerzregulierten Proteinstruktur, insbesondere PIM1-Kinase



oder verwandte Strukturen, oder über eine Proteinstruktur mit einer schmerzrelevanten Verteilung im ZNS, insbesondere PIM3-Kinase oder verwandte Strukturen, aufgefunden werden kann.

5 Dabei bezieht sich der Begriff schmerzregulierend auf einen potentiellen regulierenden Einfluß auf das physiologische Schmerzgeschehen, insbesondere auf eine analgetische Wirkung. Der Begriff Substanz umfaßt jede als Arzneimittel-Wirkstoff geeignete Verbindung, insbesondere also  
10 niedermolekulare Wirkstoffe, aber auch andere wie Nukleinsäuren, Fette, Zucker, Peptide oder Proteine wie Antikörper.

Die Inkubation unter geeigneten Bedingungen ist hier so zu verstehen, daß die zu untersuchende Substanz mit der Zelle oder der entsprechenden Präparation in einem wässrigen Medium eine definierte Zeit vor der  
15 Messung reagieren kann. Dabei kann das wässrige Medium temperiert werden, beispielsweise zwischen 4°C und 40°C, vorzugsweise bei Raumtemperatur oder bei 37°C. Die Inkubationszeit kann zwischen wenigen Sekunden und mehreren Stunden variiert werden, je nach der Wechselwirkung der Substanz mit dem Teilprotein oder Protein. Bevorzugt  
20 sind aber Zeiten zwischen 1 min und 60 min. Das wässrige Medium kann geeignete Salze und/oder Puffersysteme enthalten, so daß bei der Inkubation beispielsweise ein pH zwischen 6 und 8, vorzugsweise pH 7,0 - 7,5 im Medium herrscht. Dem Medium können weiter geeignete Substanzen, wie Coenzyme, Nährstoffe etc. beigefügt werden. Die  
25 geeigneten Bedingungen können vom Fachmann in Abhängigkeit von der zu untersuchenden Wechselwirkung der Substanz mit dem Teilprotein oder Protein aufgrund seiner Erfahrung, der Literatur oder weniger, einfacher Vorversuche leicht festgelegt werden, um im Verfahren einen möglichst deutlichen Meßwert zu erhalten.

30

Eine Zelle, die ein bestimmtes Teilprotein oder Protein synthetisiert hat, ist eine Zelle, die dieses Teilprotein oder Protein bereits endogen exprimiert.

hat oder eine solche, die gentechnisch verändert wurden, so daß sie dieses Teilprotein oder Protein exprimiert und entsprechend vor Beginn des erfindungsgemäßen Verfahrens das Teilprotein oder Protein enthält. Die Zellen können Zellen aus evt. immortalisierten Zelllinien sein oder native  
5 aus Geweben stammende und aus diesen isolierte Zellen sein, wobei der Zellverband meist aufgelöst ist. Die Präparation aus diesen Zellen umfaßt insbesondere Homogenate aus den Zellen, das Cytosol, eine Membranfraktion der Zellen mit Membranfragmenten, eine Suspension isolierter Zellorganellen etc.

10 Die hier aufgezählten Proteine und Teilproteine wurden im Rahmen dieser Erfindung als durch Schmerz reguliert oder schmerzrelevant verteilt identifiziert, in dem in einem Tier Schmerz ausgelöst wurde und nach angemessener Zeit durch Schnitte im Rückenmark das Expressionsmuster  
15 des Tieres mit denen eines Kontroll-Tieres ohne schmerzauslösende Maßnahmen verglichen. Die dabei gefundenen verändert exprimierten sind die PIM-1-Kinase sowie insbesondere bezüglich der schmerzrelevanten Verteilung die PIM-3-Kinase.

20 Aus welcher Spezies diese Proteine stammen, ist für die Funktion des Verfahrens unerheblich, es ist aber bevorzugt, die humane, Maus- oder Ratten-Variante zu verwenden. Die PIM1-Kinase ist in Hinblick auf die kodierende DNA- und die Aminosäure-Sequenz bekannt und auch in Ihrer generellen Funktion beschrieben. Das trifft zum Teil auch auf die PIM3-  
25 Kinase zu, wobei bei dieser die bisher noch nicht bekannte kodierende DNA- und die Aminosäure-Sequenz in Maus und Mensch im Rahmen dieser Erfindung aufgeklärt wurde. Keine dieser Kinasen wurde aber bisher im Stand der Technik in einen Zusammenhang mit Schmerz und insbesondere der Schmerzregulation gebracht. Da hier die Identifizierung  
30 der Proteine über eine Veränderung der Expression oder die Expressionsverteilung in einem In-vivo-Schmerzmodell erfolgte, hat das daraus abgeleitete erfindungsgemäße Screening-Verfahren für zukünftige

Arzneimittel unter Verwendung dieser Proteine den erheblichen Vorteil, nicht nur auf theoretischen Überlegungen aufzubauen, sondern vermutlich eine starke In-vivo-Relevanz zu besitzen. Da mit diesem Verfahren die Wechselwirkung von Substanzen mit im Schmerzbereich bisher nicht verwendeten Proteinen und Peptiden als Maßstab für das Auffinden schmerzregulierender Substanzen ermöglicht wird, sind mit diesem Verfahren jetzt möglicherweise schmerzrelevante Substanzen aufzufinden, die bei den im Stand der Technik bisher bekannten Verfahren mit anderen Peptiden oder Proteinen nicht aufgefallen wären. Auch dies ist ein erheblicher Vorteil des neuen erfindungsgemäßen Verfahrens.

Der Maßstab über den das Verfahren die Auffindung interessanter Substanzen erlaubt, ist entweder die Bindung an das Protein oder Teilprotein, die z.B. durch Verdrängung eines bekannten Liganden oder das Ausmaß gebundener Substanz nachgewiesen werden kann, oder die Veränderung eines funktionellen Parameters durch die Wechselwirkung der Substanz mit dem Teilprotein oder Protein. Diese Wechselwirkung kann insbesondere in einer Regulation, Hemmung und/oder Aktivierung von Rezeptoren, Ionenkanälen und/oder Enzymen liegen und veränderte funktionelle Parameter können beispielsweise die Genexpression, das Ionenmilieus, der pH oder das Membranpotentials, bzw. die Veränderung der Enzymaktivität oder der Konzentration der 2<sup>nd</sup> messenger sein.

Zur Erläuterung der Erfindung werden im folgenden neben den im allgemeinen Text zu Begriffen gegebenen Erklärungen weitere Definitionen angegeben, um klarzustellen, wie bestimmte, insbesondere in den Ansprüchen verwendete Begriffe im Sinne dieser Erfindung zu verstehen und auszulegen sind.

- Substanz: Damit ist eine chemische Verbindung gemeint. Hier handelt es sich im engeren Sinne um Verbindungen, die potentiell eine Wirkung im Körper entfalten können, niedermolekulare Wirkstoffe,

Nukleinsäuren, Fette, Zucker, Peptide oder Proteine, insbesondere hier niedermolekulare Wirkstoffe.

- 5 - schmerzregulierend: Im Sinne der Erfindung heißt schmerzregulierend, daß die Substanz die Wahrnehmung von Schmerz direkt oder indirekt beeinflusst, insbesondere natürlich analgetisch wirkt.
- 10 - Inkubation: Unter Inkubation ist das Einbringen und Belassen eines biologischen Untersuchungsobjektes, beispielsweise einer Zelle oder eines Proteins, in einem temperierten Medium wie in einem Brutschrank oder auf einem Wasserbad zu verstehen. Dabei heißt hier unter geeigneten Bedingungen eine Inkubation unter physiologischen Bedingungen (z.B. 37°C pH7,2) oder bei den Bedingungen, bei denen eine optimale Messung im Verfahren möglich wird.
- 15 - Zelle: Die Zelle ist ein sich selbst regulierendes, offenes, mit seiner Umgebung durch permanenten Stoffaustausch in einem Fließgleichgewicht stehendes System mit eigenem Stoffwechsel, und Vermehrungsfähigkeit. Die Zelle kann separat kultiviert oder Teil eines Gewebes, insbesondere aus einem Organ, sein, und dort vereinzelt oder noch im Zellverband vorliegen.
- 20 - Präparation aus einer Zelle: Darunter versteht man Präparate, die mittels chemischer, biologischer, mechanischer oder physikalischer Methoden unter Änderung der Zellstruktur hergestellt werden, beispielsweise Membranfragmente, isolierte Zellkompartimente, isoliertes Cytosol, oder aus Gewebe gewonnenes Homogenat.
- 25 - Peptid: Verbindung aus über peptidische Bindungen zu Ketten verknüpften Aminosäuren. Ein Oligopeptid besteht aus zwischen 2 und 30 Aminosäuren, ein Polypeptid aus zwischen 10 und 100 Aminosäuren.

- Protein: Verbindung aus über peptidische Bindungen zu Ketten verknüpften mehr als 100 Aminosäuren u.U. mit einer definierten Raumstruktur.
- 5 - Teilprotein: Verbindung aus über peptidische Bindungen zu Ketten verknüpften mehr als 10 Aminosäuren u.U. mit einer definierten Raumstruktur aber ausgeschnitten bzw. ausgewählt aus einem definierten Protein. Ein Teilprotein kann ein Peptid sein.
- 10 - PIM1-Kinase; PIM3-Kinase: Ein Proto-Oncogen und eine Serin-Threonin-Kinase.
- Polynukleotid: Das zugrundeliegende Nukleotid ist ein grundsätzlich aus Nucleinbase, Pentose und Phosphorsäure bestehender Grundbaustein der Nucleinsäuren. Diese entspricht einem hochmolekularen Polynucleotid aus mehreren Nukleotiden, die über Phosphorsäure-Pentose-Veresterung miteinander verknüpft sind. Unter dieser Erfindung fallen aber auch modifizierte Polynukleotide, die zwar die Basenabfolge beibehalten, aber über ein modifiziertes Rückgrat statt der Phosphorsäure-Pentose verfügen.
- 15
- 20 - zu mindestens 90 (95, 97)% ähnlich: Darunter ist zu verstehen, daß die mit erfaßten Polynucleotide in ihrem kodierenden Bereich bezüglich der Basenabfolge zu mindestens 90% (95%, 97%) identisch mit der Referenz (Abbildung etc.) sind und die mit erfaßten Peptide und Proteine in ihrer Primärstruktur, der Abfolge der Aminosäuren zu mindestens 90% (95%, 97%) mit der Referenz identisch sind.
- 25
- Gen: Mit dem Begriff Gen wird ein Genomabschnitt mit einer definierten Nukleotidsequenz bezeichnet, der die Information zur Synthese einer m- oder prä-mRNA oder einer sonstigen RNA (z.B. tRNA, rRNA, snRNA
- 30

etc.) enthält. Es besteht aus kodierenden und nicht kodierenden Abschnitten.

- 5      - Genfragment: Nukleinsäureabschnitt, der in seiner Basenabfolge einen Teilbereich eines Gens beinhaltet
- 10     - Bindung an das Peptid, Teilprotein oder Protein: Wechselwirkung zwischen Substanz und Peptid, Teilprotein oder Protein, die zu Fixierung führt.
- 15     - funktionelle Parameter: darunter versteht man Meßgrößen eines Experimentes, die mit der Funktion eines Proteins (Ionenkanal, Rezeptor, Enzym) korrelieren
- 20     - gentechnisch manipuliert: Manipulation von Zellen, Geweben oder Organismen derart, daß hier genetisches Material eingebracht wird
- 25     - endogen exprimiert: Expression eines Proteins, die eine Zelllinie unter geeigneten Kulturbedingungen aufweist, ohne das dieses entsprechende Protein durch gentechnische Manipulation zur Expression veranlasst wurde
- 30     - G-Protein: International übliche Abkürzung für ein Gunaosintriphosphat (GTP)-bindendes Protein, das als Signalprotein durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert wird
- Reporteragen: Generelle Bezeichnung für Gene, deren Genprodukte sich mit Hilfe einfacher biochemischer Methoden oder histochemischer Methoden einfach nachweisen lassen, wie z.B. Luziferase, alkalische Phosphatase oder Green Fluorescent Protein (GFP).

- (rekombinantes) DNA-Konstrukt: Generelle Bezeichnung für jede Art von DNA-Molekülen, die durch die in vitro-Verknüpfung von DNA-Molekülen entstanden sind.
- 5 - Klonierungsvektor: Generelle Bezeichnung für Nukleinsäure-Moleküle, die beim Klonieren als Träger von Fremdgenen oder Teilen dieser Gene dienen.
- Expressionsvektor: Bezeichnung für speziell konstruierte  
10 Klonierungsvektoren, die nach Einbringen in eine geeignete Wirtszelle die Transcription und Translation des in den Vektor einklonierten Fremdgens erlauben.
- LTR-Sequenz: Abkürzung für Long terminal repeat. Generelle  
15 Bezeichnung für längere Sequenzbereiche, die an beiden Enden eines linearen Genoms zu finden sind. Derartige Sequenzbereiche kommen z.B. in den Genomen von Retroviren und an den Enden eukaryontischer Transposons vor.
- 20 - Poly-A-Schwanz: die am 3'-Ende von messenger-RNAs durch Polyadenylierung angehefteten Adenyl-Reste (ca. 20-250).
- Promotor-Sequenz: Bezeichnung für einen DNA-Sequenzbereich, von dem aus die Transkription eines Gens, d.h. die Synthese der mRNA,  
25 gesteuert wird.
- ORI-Sequenz: Abkürzung für Origin of replication. Die ORI-Sequenz erlaubt einem DNA-Molekül, sich als autonome Einheit in der Zelle zu vermehren.

30

- Enhancer-Sequenz: Bezeichnung für relativ kurze, zum Teil als Repetitionen auftretende, genetische Elemente, die in der Regel die Expression mancher Gene in unterschiedlichem Maße verstärken.
- 5 - Transkriptionsfaktor: Bezeichnung für ein Protein, das über eine Bindung an spezifische DNA-Sequenzen, die Transkription eines Gens beeinflusst.
- kultivieren: Zellen oder Gewebe unter geeigneten Kulturbedingungen halten
- 10 - Bedingungen, die eine Expression erlauben, darunter versteht man die Auswahl und Anwendung von Kulturbedingungen die eine Expression des interessierenden Proteins erlauben, darunter gehören Temperaturänderung, Mediumwechsel, Zusatz von induzierenden Substanzen, Weglassen hemmender Substanzen.
- 15 - Inkubationszeit: Zeitdauer für die Zellen oder Gewebe inkubiert, d.h. einer definierten Temperatur ausgesetzt werden.
- 20 - Selektionsdruck: Anwendungen von Kulturbedingungen die Zellen mit einem bestimmtem Genprodukt, dem sog. Selektionsmarker, einen Wachstumsvorteil verschaffen.
- 25 - Amphibienzelle, Zelle aus einem Tier der Klasse der Amphibia
- Bakterienzelle, Zelle die dem Überreich der Eubacteria oder Archaeobacteria zuzuordnen ist, oder von ihr abstammt.
- 30 - Hefezelle, Zelle die der Ordnung der Endomycetalse zuzuordnen ist, oder von ihr abstammt.



- Insektenzelle, Zelle die der Ordnung der Hexapoda zuzuordnen ist, oder von ihr abstammt.
- 5 - native Säugetierzelle, aus einem Säugetier stammende Zelle, die in ihren relevanten Merkmalen der im Organismus befindlichen Zelle entspricht.
- 10 - immortalisierte Säugetierzelle: Zelle die durch die angewendeten Kulturbedingungen oder gentechnische Manipulation die Eigenschaft erlangt hat, sich über die normalerweise übliche Teilungshäufigkeit hinaus (ca.100) in der Kultur zu teilen.
- 15 - markiert: durch entsprechende Modifizierung oder Derivatisierung für eine Nachweisreaktion zugänglich gemacht. Beispielsweise radioaktiv, fluoreszierend oder lumineszierend.
- Ligand: Substanz, die an ein im Körper oder einer Zelle befindliches Molekül, im speziellen einen Rezeptor, bindet
- 20 - Verdrängung: vollständiges oder partielles Entfernen eines Liganden von seiner Bindungsstelle
- gebundene Aktivität: Biochemisch oder physikalisch erfaßter Meßwert, der mit der an einem Rezeptor gebundenen Ligandenmenge korreliert
- 25 - Regulation: die als Teil eines Regelprozesse erfolgte Hemmung oder Aktivierung eines Vorgangs
- Hemmung: als Sonderfall der Regulation die Verhinderung/Minderung
- 30 eines Vorgangs

- Aktivierung: als Sonderfall der Regulation die Verstärkung eines Vorgangs
- Rezeptoren: Im weitesten Sinne alle im pro- oder eukaryoten Organismus vorhandenen Moleküle, an die ein Wirkstoff binden kann. Im engeren Sinne membrangebundene Proteine oder Komplexe mehrerer Proteine, die durch Bindung eines Wirkstoffes eine Änderung in der Zelle hervorrufen.
- Ionenkanäle: Membrangebundene Proteine oder Komplexe mehrerer Proteine, durch die Kationen oder Anionen durch die Membran hindurchgelangen können.
- Enzyme: Bezeichnung für Proteine oder Komplexe aus einer aktivierenden Nichteiweißkomponente mit einem Protein, die katalytische Eigenschaften besitzen.
- Genexpression (exprimieren/exprimierbar): das Übersetzen der genetischen Information eines Genes in RNA (RNA-Expression) oder in Protein (Proteinexpression).
- Ionenmilieu: Ionenkonzentration eines oder mehrerer Ionen in einem bestimmten Kompartiment.
- Membranpotential: Spannungsdifferenz über eine Membran aufgrund eines Überschusses an Kationen auf der einen Seite und Anionen auf der anderen Seite der Membran.
- Veränderung der Enzymaktivität: Hemmung oder Induktion der katalytischen Aktivität eines Enzyms.

- 2<sup>nd</sup> messenger: kleines Molekül, das als Antwort auf ein extrazelluläres Signal entweder im Cytosol gebildet wird oder in das Cytosol hineinwandert und dabei hilft die Information an das Zellinnere weiterzugeben, wie zum Beispiel cAMP, IP<sub>3</sub>.

5

- (Gen-)Sonde: Bezeichnung für jede Art von Nukleinsäuren, mit deren Hilfe man ein gesuchtes Gen oder eine bestimmte DNA-Sequenz nachweisen kann. Durch Derivatisierung der Gensonde (z.B. Biotin, magnetische Beads, Digoxinin) können zudem DNA-Moleküle aus einem Gemisch herausgezogen werden. Als Sonden werden klonierte Gene, Genfragmente, chemisch synthetisierte Oligonukleotide und auch RNA verwendet, die meist radioaktiv markiert ist.

10

- DNA: Internationale Bezeichnung für Desoxyribonukleinsäure

15

- genomische DNA: Generelle Bezeichnung für die bei eukaryontischen Organismen aus dem Zellkern einer Zelle stammenden DNA.

- cDNA: Abkürzung für complementary DNA. Bezeichnung für die einzel- bzw. doppelsträngige DNA-Kopie eines RNA-Moleküls.

20

- cDNA-Bank/Bibliothek: Bezeichnung für eine Sammlung von willkürlich klonierten cDNA-Fragmenten, die zusammengekommen die Gesamtheit aller von einer Zelle oder einem Gewebe synthetisierten RNA repräsentieren.

25

- cDNA-Klon: Bezeichnung für eine Population genetisch einheitlicher Zellen, die sich von einer einzigen Zelle ableiten, derart, daß diese Zelle eine künstlich eingebrachtes cDNA-Fragment enthält.

30

- Hybridisierung: Durch Basenpaarung bewirkte Ausbildung eines doppelsträngigen Nukleinsäuremoleküls aus zwei getrennten Einzelsträngen.
- 5 - stringente Bedingungen: Bedingungen, unter denen nur perfekt basengepaarte Nukleinsäure-Stränge gebildet werden und stabil bleiben.
- isolieren: ein gesuchtes Molekül aus einem Gemisch herausfinden und  
10 abtrennen.
- DNA-Sequenzierung: Bestimmung der Abfolge der von Basen in einem DNA-Molekül.
- 15 - Nukleinsäuresequenz: Bezeichnung für die Primärstruktur eines DNA-Moleküls, d.h. die Abfolge der einzelnen Basen, aus denen sich eine DNA zusammensetzt.
- Gen-spezifische Oligonukleotid Primer: Oligonukleinsäuren, also 10-40  
20 Basen lange Nukleinsäurefragmente, die in ihrer Basenzusammensetzung eine stringente Hybridisierung an das gesuchte Gen oder die gesuchte cDNA erlauben.
- Ermitteln von Oligonukleotid Primern: Die manuelle oder  
25 Computerunterstützte Suche von Oligonukleotiden zu einer vorgegebenen DNA-Sequenz, die für eine Hybridisierung und/oder eine Polymerase-Ketten Reaktion optimal geeignet sind.
- PCR: Abkürzung für Polymerase-Kettenreaktion. In vitro-Verfahren zur  
30 selektiven Anreicherung von Nucleinsäure-Bereichen definierter Länge und definierter Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäure-Molekülen.

- DNA-Template: Nukleinsäuremolekül oder ein Gemisch von Nukleinsäuremolekülen, aus denen ein DNA-Abschnitt mit Hilfe der PCR (s.o.) vervielfältigt wird.
- RNA: International gebräuchliche Abkürzung für Ribonukleinsäuren
- mRNA: International gebräuchliche Abkürzung für messenger-Ribonukleinsäuren, die am Transfer der genetischen Information aus dem Kern in die Zelle beteiligt sind und die Information für die Synthese eines Polypeptids oder eines Proteins beinhalten.
- Antisense Polynukleotid: Eine aus mehreren natürlichen oder modifizierten Nukleinsäuren bestehendes Molekül, deren Basenabfolge komplementär zur Basenabfolge eines Teilbereiches einer in der Natur vorkommenden RNA ist.
- PNA: International gebräuchliche Abkürzung für peptidic Nucleic Acids. Hierbei bilden peptidisch verknüpfte Aminosäuren eine Kette, wobei die Aminosäuren als Seitenkette eine für die Hybridisierung mit DNA oder RNA fähigen Base trägt.
- Sequenz: Abfolge von Nukleotiden oder Aminosäuren. Im spezifischen Sinne dieser Erfindung ist damit die Nukleinsäuresequenz gemeint.
- Ribozym: Bezeichnung für eine katalytisch aktive Ribonukleinsäure (z.B. Ligase, Endonuklease, Polymerase, Exonuklease)
- DNA-Enzym: Bezeichnung für ein DNA-Molekül, das katalytische Aktivität beinhaltet (z.B. Ligase, Endonuklease, Polymerase, Exonuklease)

- katalytische RNA/DNA: generelle Bezeichnung für Ribozyme bzw. DNA-Enzyme (s.o.).
- Adenovirus: bei Vertebraten vorkommender cytopathogener Virus
- Adenoassoziiertes Virus (AAV): Gehört zur Familie der Parvoviren. Für eine effektive Vermehrung des AAV ist eine Coinfektion der Wirtszellen mit Helferviren (z.B. Herpes-, Vaccina- oder Adenoviren) erforderlich. Die Eigenschaft von AAV, stabil in das Wirtsgenom zu integrieren, macht es als Transduktionsvektor für Säugetierzellen besonders interessant.
- Herpesvirus: Viraler Erreger der Herpes-Infektion
- posttranslationale Modifikation: Veränderung an Proteinen oder Polypeptiden, die nach der Translation durchgeführt wird, hierzu zählen z.B. Phosphorylierung, Glykosylierung, Amidierung, Acetylierung oder Proteolyse.
- glykosilieren: Bezeichnung für das Anhängen von einzelnen Zuckermolekülen oder ganzen Zuckerketten an Proteine.
- phosphorylieren: Bezeichnung für das Anhängen von einem oder mehreren Phosphatresten an ein Protein, bevorzugt an die OH-Gruppen der Aminosäuren Serin, Threonin oder Tyrosin.
- amidieren: Die Bezeichnung für das Umwandeln einer Carboxylfunktion in eine Amidfunktion, z.B. an den carboxyterminalen Aminosäurerest eines Peptides oder Proteins.

- mit Membrananker versehen: Posttranslationelle Modifikation eines Proteins, oder eines anderen organischen Moleküls, derart daß es durch Anhängen eines hydrophoben Moleküls, geeigneterweise eine Fettsäure oder ein Derivat derselben, an die Lipiddoppelschicht-Membran von Zellen verankert wird.
- spalten: in diesem spezifischen Fall die Spaltung eines Peptids oder Proteins in mehrere Untersequenzen.
- verkürzen: Ein aus mehreren Einzelteilen bestehendes Molekül um eine oder mehrere Teile zu verkürzen.
- Antikörper: Lösliche, oder an Zellmembranen gebundene, als Immunglobuline bezeichnete Proteine mit einer spezifischen Bindungsstelle für Antigene.
- monoklonaler Antikörper: sind gegen eine einzige antigene Determinante eines Antigens gerichtete Antikörper mit extrem hoher Selektivität
- polyklonaler Antikörper: Gemisch aus Antikörpern, die gegen mehrere Determinanten eines Antigens gerichtet sind.
- transgen: genetisch verändert
- nichthumanes Säugetier: Die Gesamtheit der Säugetiere (Klasse der Mammalia) mit Ausnahme der Spezies Mensch.
- Keim-Zelle: Zelle mit haploidem Genom, die durch Verschmelzung mit einer zweiten Keimzelle die Bildung eines neuen Organismus ermöglicht.

- somatische Zelle: diploide Zelle als Bestandteil eines Organismus
- chromosomale Einbringung: Eingriff in die Nukleotidsequenz auf chromosomaler Ebene
- 5 - Genom: Allgemeine Beschreibung für die Gesamtheit aller Gene in einem Organismus
- Vorfahr des Tieres: Ein Tier (der Vorfahr), das auf natürliche oder künstliche Weise durch Weitergabe an seinem genetischen Material in direkter Linie mit einem anderen Tier (dem Nachfahren) verwandt ist.
- 10 - exprimierbar: Ein Nukleinsäuremolekül ist dann exprimierbar, wenn es die Information zur Synthese eines Proteins oder Polypeptids beinhaltet und mit entsprechenden regulatorischen Sequenzen versehen ist, die eine Synthese dieses Proteins oder Polypeptids in vitro oder in vivo erlauben. Wenn diese Voraussetzungen nicht mehr gegeben sind, beispielsweise durch Eingriff in die kodierende Sequenz, ist das Nukleinsäuremolekül nicht mehr exprimierbar.
- 15 - Nagetier: Tier aus der Ordnung der Rodentia, z.B. Ratte oder Maus
- als schmerzregulierende Substanz identifizierbar: Substanz, die bei Einbringung in einen lebenden Organismus eine Verhaltensänderung bewirkt, die der Fachmann als schmerzhemmend bezeichnet (antinozizeptiv, antihyperalgetisch oder antiallodynisches). Im Falle des Screeningverfahrens bezieht sich das darauf, daß die Substanz beim Screening durch stärkere Bindung oder Auslösung einer Änderung eines funktionellen Parameters deutlich, beispielsweise 100 %, die Bindung oder Wechselwirkung des Durchschnitts der getesteten Substanzen übertrifft.
- 20
- 25
- 30



- Verbindung: ein anderer Name für Molekül, als aus mehreren Atomen bestehend, hier ein durch das erfindungsgemäße Verfahren identifiziertes Molekül.
- 5 - Wirkstoff: Eine Verbindung, die bei Anwendung an einem Organismus eine Veränderung in diesem Organismus hervorruft. Im Besonderen werden darunter organisch-chemisch synthetisierte Moleküle verstanden, die auf den Organismus eine heilende Wirkung ausüben. Hier insbesondere Moleküle, die an die erfindungsgemäßen Proteine  
10 und Peptide binden.
- niedermolekular: Molekül mit einem Molekulargewicht < 2kDa
- Arzneimittel: ein Stoff entsprechend der Definition im Artikel 1 §2 des  
15 Gesetzes über den Verkehr mit Arzneimitteln
- Diagnostikum: Verbindung oder Verfahren, das verwendet werden kann, um eine Krankheit zu diagnostizieren
- 20 - Behandlung von Schmerz: Verfahren, mit dem Ziel Schmerzen zu lindern oder aufzuheben, oder das zu erwartende Auftreten von Schmerzen zu hemmen (preemptive Analgesie).
- chronischer Schmerz: eine Schmerzempfindung von länger anhaltender  
25 Dauer, oft dadurch gekennzeichnet, daß sie über Zeitpunkt und Ort des initialen Stimulus hinausreicht, die Schmerzempfindlichkeit des Körpers steigert.
- Gentherapie: Unter Gentherapie versteht man alle Verfahren, die das  
30 Ziel haben, genetische Erkrankungen durch geeignete Veränderungen des Genoms kausal zu behandeln.

- In-vivo-Gentherapie: Einbringen von genetischem Material in den lebenden Organismus mit dem Ziel der Gentherapie. Man kann zwischen somatischem und Keimbahn-Eingriff unterscheiden, der einmal an diploiden Zellen und einmal an haploiden Zellen stattfindet.

5

- In-vitro-Gentherapie: Einbringen von genetischem Material in Zellen außerhalb des menschlichen Körpers mit dem Ziel diese nachher wieder durch Einbringen in den menschlichen Körper zur Gentherapie zu verwenden.

10

- Diagnostik: Verfahren, um eine Krankheit zu identifizieren.

- Wirksamkeitsuntersuchung: Untersuchung mit dem Ziel die Wirksamkeit einer Verbindung nach Einwirkung auf einen lebenden Organismus zu untersuchen.

15

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens wird die Zelle vor dem Schritt (a) gentechnisch manipuliert. Dabei wird genetisches Material in die Zelle eingebracht, insbesondere eine oder mehrere Polynukleotidsequenzen. In einer weiter bevorzugten Variante dieser Ausführungsform erlaubt die gentechnische Manipulation die Messung mindestens eines der durch die Testsubstanz veränderten funktionellen Parameter. In dieser Ausführungsform werden durch gentechnische Manipulation Voraussetzungen geschaffen unter denen die Veränderung eines funktionellen Parameters überhaupt oder verbessert gemessen werden kann. Dabei ist es insbesondere bevorzugt, daß durch die gentechnische Manipulation eine in der Zelle nicht endogen exprimierte Form eines G-Proteins exprimiert oder ein Reportergen eingeführt wird. Darunter ist insbesondere die gentechnische Einführung eines endogen nicht vorhandenen oder physiologisch nicht exprimierten G-Proteins (GTP-bindenden Proteins) in die Zelle zu verstehen, beispielsweise die Einführung eines chimären G-Proteins, das eine Veränderung des

20

25

30

Signalweges erlaubt oder eines promiskuitiven G-Proteins, das sehr bindungsfreudig ist. Die Einführung eines Reportergens wiederum erlaubt die Messung einer (extrazellulär ausgelösten) induzierten Expression des Genproduktes.

5

10

15

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Zelle gentechnisch so manipuliert, daß die Zelle mindestens ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid enthält. Damit kann beispielsweise erreicht werden, daß ein Teilprotein oder Protein, das in der im Verfahren verwendeten Zelle oder Präparation nicht endogen exprimiert wird, von der Zelle synthetisiert wird. Dabei ist es insbesondere bevorzugt, wenn das Polynukleotid in einem rekombinanten DNA-Konstrukt enthalten ist. Unter einem (rekombinanten) DNA-Konstrukt versteht man ein in-vitro hergestelltes DNA-Molekül.

20

25

30

Wenn beim Verfahren vor dem Schritt a) die Zelle gentechnisch manipuliert wird, ist es bevorzugt, daß die Zelle nach der gentechnischen Manipulation und vor dem Schritt (a) unter Bedingungen, die eine Expression erlauben, kultiviert wird, gegebenenfalls unter Selektionsdruck. Unter kultivieren versteht man, Zellen oder Gewebe bei Bedingungen, die ein Überleben der Zellen, bzw. deren Nachfolgeneration sichern, zu halten. Dabei sollten die Bedingungen hier so gewählt werden, daß eine Expression des durch die gentechnische Manipulation eingefügten Materials ermöglicht wird. Dazu sollten pH, Sauerstoffgehalt, und Temperatur physiologisch gehalten sein und ausreichend Nährstoffe und notendige Cofaktoren beigelegt sein. Der Selektionsdruck erlaubt, nur die Zellen weiter zu kultivieren, bei denen die gentechnische Manipulation zumindest teilweise erfolgreich war. Dazu gehört beispielsweise die Einführung einer Antibiotikaresistenz über das DNA-Konstrukt.

Es ist bei dem erfindungsgemäßen Verfahren besonders bevorzugt, wenn die verwendete Zelle eine Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder eine immortalisierte oder native Säugetierzelle ist. Beispiele für Amphibienzellen sind Xenopus Oocyten, für Bakterienzellen E-coli-Zellen, für Hefezellen solche auch Saccharomyces cerevisiae, für Insektenzellen Sf9-Zellen, für immortalisierte Säugetierzelle HeLa-Zellen und für native Säugetierzellen die CHO (Chinese Hamster Ovary)-Zelle.

Bei einer bevorzugten Meßmethode zur Feststellung der Bindung der Substanz an Teilprotein oder Protein im erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt die Messung der Bindung über die Verdrängung eines bekannten markierten Liganden vom Teilprotein oder Protein und/oder über die daran gebundene Aktivität einer markierten Testsubstanz. Dabei ist ein Ligand ein mit hoher Spezifität an das Protein oder Teilprotein bindendes Molekül, das durch eine ebenfalls bindende, zu testende Substanz aus der Bindungsstelle verdrängt wird. Unter Markierung ist eine den Nachweis erleichternde künstliche Modifikation am Molekül zu verstehen. Beispiele sind radioaktive, fluoreszierende oder lumineszierende Markierung.

Bei einer anderen bevorzugten Meßmethode zur Feststellung der durch die Bindung der Substanz an Teilprotein oder Protein im erfindungsgemäßen Verfahren ausgelösten Veränderung der funktionellen Parameter, erfolgt die Messung mindestens eines der durch die Testsubstanz veränderten funktionellen Parameter über Messung der Regulation, Hemmung und/oder Aktivierung von Rezeptoren, Ionenkanälen und/oder Enzymen, insbesondere über Messung der Veränderung der Genexpression, des Ionenmilieus, des pH oder des Membranpotentials, über Veränderung der Enzymaktivität oder der Konzentration der 2<sup>nd</sup> messenger. Damit ist auf der einen Seite direkt die Messung der Wirkung der Substanz über die Beeinflussung von Rezeptoren, Ionenkanälen und/oder Enzymen erfaßt, auf der anderen Seite als bevorzugt zu messende Beispiele sich ändernder Parameter wie Genexpression, Ionenmilieu, pH, Membranpotential,

Enzymaktivität oder Konzentration der 2<sup>nd</sup> messenger. Dabei versteht man unter Ionenmilieu insbesondere die Konzentration eines oder mehrerer Ionen in einem Zellkompartiment, insbesondere dem Cytosol, unter Membranpotential die Ladungsdifferenz zwischen zwei Seiten einer Biomembran und unter 2<sup>nd</sup> messenger Botenstoffe des intrazellulären Signalwegs wie z.B. zyklisches AMP (cAMP), Inositoltriphosphat (IP3) oder Diacylglycerol (DAG).

In einer bevorzugten Variante des Verfahrens wird das Teilprotein oder Protein in den Schritten (a) und (b) ausgewählt aus:

- der PIM-1-Kinase,
- einem Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder ein dazu zu mindestens 90 %, vorzugsweise 95%, insbesondere 97%, ähnliches Polynukleotid kodiert,
- einem Protein mit einer Aminosäuresequenz gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d) oder 1f), oder einem dazu zu mindestens 90 %, vorzugsweise 95%, insbesondere 97%, ähnlichem Protein und/oder
- einem Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder deren Antiisense Polynukleotide bindet,
- oder einem mindestens 10 Aminosäuren langen Teilprotein eines der vorgenannten Proteine.

Darunter erfaßt ist die Verwendung von Teilproteinen und insbesondere Proteinen mit bekannter Sequenz und Funktion, ohne daß für diese im Stand der Technik eine Funktion im Schmerz bekannt war.

Ein weiterer bevorzugter Gegenstand der Erfindung ist auch ein Polynukleotid, welches einer der in einer der Abbildungen 2a) und 2e)

dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht. Hiervon sind die dargestellten Genfragmente selbst umfaßt, wie auch ein Polynukleotid, das entweder vollständig oder zumindest Teilen der kodierenden Sequenz des dem  
5 Fragment entsprechenden Gens entspricht. Damit sind auch Polynukleotide gemeint, die mindestens 90%-ige, vorzugsweise 95%-ige, insbesondere wenigstens 97%-ige Übereinstimmung in der Basenabfolge mit der kodierenden Sequenz der abgebildeten Polynukleotide oder der kodierenden Sequenz der Gens aufweisen.

10 Es ist weiter bevorzugt, daß es sich bei dem Polynukleotid um RNA bzw. ein- oder doppelstängige DNA, insbesondere mRNA oder cDNA handelt.

Ebenso ist es bevorzugt, daß es sich bei dem Polynukleotid um ein  
15 Antisense-Polynukleotid oder PNA handelt, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an ein erfindungsgemäßes Polynukleotid zu binden. Dabei versteht man unter PNA „peptidic nucleic acid“ (peptidische Nukleinsäure), die zwar die Basenpaare trägt, aber dessen Rückgrat  
20 peptidisch gebunden ist. Ein Antisense-Polynukleotid zeigt die komplementäre Basenabfolge zu mindestens einem Teil einer Basis-Nukleinsäure. Ebenfalls bevorzugt ist es, daß das Polynukleotid Teil eines Ribozym oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA bzw. DNA ist. Unter Ribozym ist eine katalytisch aktive Ribonukleinsäure zu  
25 verstehen, unter DNA-Enzym ein entsprechende Desoxyribonukleinsäure, also katalytische RNA beziehungsweise DNA.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Vektor enthaltend eines dieser vorangehend beschriebenen erfindungsgemäßen Polynukleotide. Unter einem Vektor versteht man ein Nukleinsäuremolekül, das bei  
30 gentechnischer Manipulation dazu dient, Fremdgene zu enthalten bzw. zu übertragen. Besonders bevorzugt ist dabei, daß es sich um einen

Expressionsvektor handelt. Er dient damit der Expression des enthaltenen Fremdgens, des Polynukleotids.

5 Weiter bevorzugt ist ein derartiger Vektor, der abgeleitet ist von einem Virus, beispielsweise dem Adenovirus, Adenoassoziiertem Virus oder Herpesvirus und/oder er mindestens eine LTR-, Poly A-, Promotor- und/oder ORI-Sequenz enthält. Ein LTR ist ein „Long-TerminalRepeat“, ein am Ende befindlicher Abschnitt beispielsweise bei Viren. Poly-A-Sequenz ist ein mehr als 20 Adenosinreste langer Schwanz. Eine Promotorsequenz  
10 ist der Steuerungsbereich für die Transkription.

Ein weiterer Gegenstand ist ein Protein bzw. ein daraus abgeleitetes Teilprotein, das durch eines der bereits als separate Gegenstände der Erfindung beschriebenen Polynukleotide kodiert wird.

15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch ein Protein bzw. ein daraus abgeleitetes Teilprotein, für das ein Polynukleotid kodiert, daß unter stringenten Bedingungen mit einem der Polynukleotide gemäß Abbildung 2a) oder 2e) oder deren Antisense-Polynukleotid hybridisiert.

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch ein Protein bzw. ein daraus abgeleitetes Teilprotein, welches einer der in einer der Abbildungen 2b) oder 2f) dargestellten Aminosäuresequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht.

25 Es ist auch Gegenstand dieser Erfindung, wenn das Protein bzw. ein daraus abgeleitetes Teilprotein posttranslational modifiziert wurde, es insbesondere glykosiliert, phosphoryliert, amidiert, methyliert, acetyliert, ADP-ribosyliert, hydroxyliert, mit einem Membrananker versehen, gespalten  
30 oder verkürzt wurde. Posttranslationale Modifikationen sind beispielsweise dem Voet/Voet, Biochemistry, 1<sup>st</sup> Edition, 1990, S. 935-938 zu entnehmen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Antikörper gegen ein bereits als separater Gegenstand der Erfindung beschriebenes Protein bzw. Teilprotein. Dabei ist es bevorzugt, wenn es sich bei dem Antikörper um einen monoklonalen oder polyklonalen Antikörper handelt.

5

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Zelle, enthaltend ein bereits als separaten Gegenstand der Anmeldung beschriebenes Polynukleotid, ein bereits als separaten Gegenstand der Anmeldung beschriebenes Protein oder Teilprotein und/oder einen bereits als separaten Gegenstand der Anmeldung beschriebenen Vektor. Dabei ist es besonders bevorzugt, wenn es sich um eine Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder eine immortalisierte oder native Säugetierzelle handelt. Beispiele für Amphibienzellen sind *Xenopus* Oocyten, für Bakterienzellen *E. coli*-Zellen, für Hefezellen solche auch *Saccharomyces cerevisiae*, für Insektenzellen Sf9-Zellen, für immortalisierte Säugetierzelle HeLa-Zellen und für native Säugetierzellen die CHO (Chinese Hamster Ovary)-Zelle.

10

15

Die besonders ausgewählte Form der Zelle enthält eine besonders ausgewählte Form des Polynukleotids, eine besonders ausgewählte Form des Proteins oder Teilproteins und/oder eine besonders ausgewählte Form des Vektors.

20

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein transgenes nichthumanes Säugetier, dessen Keim- und somatische Zellen eine der bereits als separaten Gegenstand der Erfindung beschriebenen Polynukleotide als Resultat einer chromosomalen Einbringung in das Genom des Tieres oder das Genom eines der Vorfahren des genannten Tieres enthalten. Dabei versteht man unter chromosomaler Einbringung, dass der gentechnische manipulative Eingriff sich im Chromosom des Tieres auswirkt.

25

30

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein transgenes nichthumanes Säugetier, dessen Keim- und somatische Zellen als Resultat einer



chromosomalen Manipulation im Genom des Tieres oder im Genom eines der Vorfahren des genannten Tieres eine der separaten Gegenstand der Erfindung beschriebenen Polynukleotide, die keine Anti-Sense-Nukleotide sind, insbesondere gemäß Abbildung 2a) oder 2e), nicht mehr in exprimierbarer Form enthalten. Die chromosomale Manipulation betraf das Gen des Tieres oder seiner Vorfahren. Unter nicht mehr exprimierbar versteht man, wenn die Information zur Synthese eines Polypeptids oder Proteins, obwohl in nativer Form vorhanden, nicht mehr die vollständige Synthese erlauben. Beispiele sind Veränderung der regulatorischen Sequenzen oder Herausschneiden eines Teils des nativen Nukleinsäuremoleküls im kodierenden Bereich.

Dabei ist es besonders bevorzugt, wenn das transgene nichthumane Säugetier ein Nagetier ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Verbindung identifizierbar als schmerzregulierende Substanz durch ein erfindungsgemäßes Verfahren. Hierbei bezieht sich Verbindung insbesondere auf niedermolekulare Wirkstoffe, aber auch auf Peptide, Proteine und Nukleinsäuren. Dabei bedeutet identifizierbar, daß die Verbindung das Merkmal aufweist, daß es beim erfindungsgemäßen Screeningverfahren bezüglich der Bindung deutlich stärker, vorzugsweise doppelt so stark bindet wie der Durchschnitt der zu testenden Substanzen oder bezüglich der Änderung der funktionellen Parameter deutlich vom Durchschnitt der zu testenden Substanzen abweicht.

Eine besonders ausgewählte Form der erfindungsgemäße Verbindung ist durch ein Verfahren unter Verwendung eines Proteins oder Teilproteins in den Schritten (a) und (b), das ausgewählt ist aus:

- der PIM-1-Kinase,
- einem Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder ein dazu zu

mindestens 90 %, vorzugsweise 95%, insbesondere 97%, ähnliches Polynukleotid kodiert,

- einem Protein mit einer Aminosäuresequenz gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), oder einem dazu zu mindestens 90 %, vorzugsweise 95%, insbesondere 97%, ähnlichem Protein und/oder
- einem Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder deren Antisense Polynukleotide bindet,
- oder einem mindestens 10 Aminosäuren langen Teilprotein eines der vorgenannten Proteine,

als schmerzregulierende Substanz identifizierbar ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Arzneimittel enthaltend

- a. ein Polynukleotid kodierend für PIM1- Kinase oder PIM3- Kinase oder ein Polynukleotid, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
- b. ein Polynukleotid, insbesondere Antisense Polynukleotid oder PNA, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- c. einen Vektor enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b)
- d. eine PIM-1-Kinase oder PIM-3-Kinase und/oder ein Protein gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b), 2d) oder 2f) und/oder ein zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Protein und/oder ein Protein, für

das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder ein Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder deren Antisense Polynukleotide binden oder ein mindestens 10 Aminosäuren langes Teilprotein eines der vorgenannten Proteine,

- e. einen Antikörper gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),
- f. eine Zelle enthaltend eine Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e)
- g. eine Verbindung, die durch ein erfindungsgemäßes Verfahren als schmerzregulierende Substanz identifiziert wurde, und/oder
- h. einen Wirkstoff, der an ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt a) bindet,

sowie gegebenenfalls geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe. Die erfindungsgemäßen Arzneimittel können als flüssige Arzneiformen in Form von Injektionslösungen, Tropfen oder Säfte, als halbfeste Arzneiformen in Form von Granulaten, Tabletten, Pellets, Patches, Kapseln, Pflaster oder Aerosolen verabreicht werden und enthalten neben den mindestens einem erfindungsgemäßen Gegenstand je nach galenischer Form gegebenenfalls Trägermaterialien, Füllstoffe, Lösungsmittel, Verdünnungsmittel, Farbstoffe und/oder Bindemittel. Die Auswahl der Hilfsstoffe sowie die einzusetzenden Mengen derselben hängt davon ab, ob das Arzneimittel oral, peroral, parenteral, intravenös, intraperitoneal, intradermal, intramuskulär, intranasal, buccal, rectal oder örtlich, zum Beispiel auf Infektionen an der

Haut, der Schleimhäute und an den Augen, appliziert werden soll. Für die orale Applikation eignen sich Zubereitungen in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Granulaten, Tropfen, Säften und Sirupen, für die parenterale, topische und inhalative Applikation Lösungen, Suspensionen, leicht rekonstituierbare Trockenzubereitungen sowie Sprays. Erfindungsgemäße Gegenstände in einem Depot in gelöster Form oder in einem Pflaster, gegebenenfalls unter Zusatz von die Hautpenetration fördernden Mitteln, sind geeignete perkutane Applikationszubereitungen. Oral oder perkutan anwendbare Zubereitungsformen können die erfindungsgemäßen Gegenstände verzögert freisetzen. Die an den Patienten zu verabreichende Wirkstoffmenge variiert in Abhängigkeit vom Gewicht des Patienten, von der Applikationsart, der Indikation und dem Schweregrad der Erkrankung. Üblicherweise werden 2 bis 500 mg/kg wenigstens eines erfindungsgemäßen Gegenstandes appliziert. Wenn das Arzneimittel insbesondere zur Gentherapie verwendet werden soll, empfehlen sich als geeignete Hilfs- oder Zusatzstoffe beispielsweise eine physiologische Kochsalzlösung, Stabilisatoren, Proteinase-, DNase-Inhibitoren etc.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Diagnostikum enthaltend mindestens

- a. ein Polynukleotid kodierend für PIM1- Kinase oder PIM3-Kinase oder ein Polynukleotid, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
- b. ein Polynukleotid, insbesondere Antisense Polynukleotid oder PNA, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- c. einen Vektor enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b)

- d. eine PIM-1-Kinase oder PIM-3-Kinase und/oder ein Protein gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b), 2d) oder 2f) und/oder ein zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Protein und/oder ein Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder ein Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder deren Antisense Polynukleotide binden oder ein mindestens 10 Aminosäuren langes Teilprotein eines der vorgenannten Proteine,
- e. einen Antikörper gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),
- f. eine Zelle enthaltend eine Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e)
- g. eine Verbindung, die durch ein erfindungsgemäßes Verfahren als schmerzregulierende Substanz identifiziert wurde, und/oder
- h. einen Wirkstoff, der an ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt a) bindet,

sowie gegebenenfalls geeignete Zusatzstoffe. Dabei versteht man unter Diagnostikum ein Hilfsmittel zur Diagnose beispielsweise eines Krankheitsgeschehens.

Bevorzugt ist auch eine Form des Diagnostikums, das ein Polynukleotid enthält, bei dem es sich um ein Antisense Polynukleotid oder PNA handelt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung

- a. eines Polynukleotids kodierend für PIM1- Kinase oder PIM3-Kinase oder eines Polynukleotids, welches einer der in einer

der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,

- 5           b. eines Polynukleotids, insbesondere Antisense Polynukleotid oder PNA, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b)
- 10          d. einer PIM-1-Kinase oder PIM-3-Kinase und/oder eines Proteins gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b), 2d) oder 2f) und/oder eines zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Proteins und/oder eines Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der
- 15           Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder eines Proteins, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder
- 20           deren Antisense Polynukleotide binden oder eines mindestens 10 Aminosäuren langen Teilproteins eines der vorgenannten Proteine,
- e. eines Antikörpers gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),
- 25          f. einer Zelle enthaltend eine Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e)
- g. einer Verbindung, die durch ein erfindungsgemäßes
- 30           Verfahren als schmerzregulierende Substanz identifiziert wurde, und/oder

- h. eines Wirkstoffs, der an ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt a) bindet,

zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Schmerz.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung zur Behandlung des chronischen, insbesondere neuropathischen oder entzündungsbedingten Schmerzes.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung

- a. eines Polynukleotids kodierend für PIM1- Kinase oder PIM3- Kinase oder eines Polynukleotids, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
- b. eines Polynukleotids, insbesondere Antisense Polynukleotid oder PNA, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b)
- f. einer Zelle enthaltend eine Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b) oder einen Vektor gemäß Punkt c)

für die Gentherapie. Dabei ist es besonders bevorzugt, wenn es sich um In-vivo oder In-vitro Gentherapie handelt. Unter Gentherapie versteht man eine Therapieform, bei der durch die Einführung von Nukleinsäuren in Zellen ein Effektorgen, meist ein Protein, exprimiert wird. Man unterscheidet prinzipiell In-vivo- und In-vitro-Verfahren. In In-vitro-Verfahren werden Zellen aus dem Organismus entfernt und ex-vivo mit Vektoren transfiziert, um anschließend wieder in denselben oder in einen anderen Organismus eingebracht zu werden. Bei der In-vivo-Gentherapie werden

Vektoren, beispielsweise zur Bekämpfung von Tumoren, systemisch (z.B. über die Blutbahn) oder direkt in das Zielgewebe (z.B. in einen Tumor) appliziert.

5 Bevorzugt beim Einsatz in der Gentherapie ist auch die Verwendung eines Polynukleotids, beim dem es sich um ein Antisense Polynukleotid oder PNA handelt, oder das Teil eines Ribozyms oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA oder DNA ist.

10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung

- 15 a. eines Polynukleotids kodierend für PIM1- Kinase oder PIM3- Kinase oder eines Polynukleotids, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
- 20 b. eines Polynukleotids, insbesondere Antisense Polynukleotid oder PNA, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b)
- 25 d. einer PIM-1-Kinase oder PIM-3-Kinase und/oder eines Proteins gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b), 2d) oder 2f) und/oder eines zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Proteins und/oder eines Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder
- 30 eines Proteins, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder



deren Antisense Polynukleotide binden oder eines mindestens 10 (vorzugsweise 20) Aminosäuren langen Teilproteins eines der vorgenannten Proteine,

- e. eines Antikörpers gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),
- f. einer Zelle enthaltend eine Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e)
- g. einer Verbindung, die durch ein erfindungsgemäßes Verfahren als schmerzregulierende Substanz identifiziert wurde, und/oder
- h. eines Wirkstoffs, der an ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt a) bindet,

für die Diagnostik und/oder für Wirksamkeitsuntersuchungen. Dabei versteht man unter Diagnostik die Analyse von einem Krankheitsbild zugeordneten Symptomen und unter Wirksamkeitsuntersuchungen Untersuchungen über die Wirksamkeit zu testender Substanzen, insbesondere ihrer medizinischen Wirksamkeit.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Peptids oder Proteins, bei dem eine erfindungsgemäße Zelle, die ein erfindungsgemäßes Polynukleotid und/oder einen erfindungsgemäßen Vektor enthält, kultiviert und gegebenenfalls das Peptid oder Protein isoliert wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung

- a. eines Polynukleotids kodierend für PIM1- Kinase oder PIM3- Kinase oder eines Polynukleotids, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten

Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,

- b. eines Polynukleotids, insbesondere Antisense Polynukleotid oder PNA, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b)
- d. einer PIM-1-Kinase oder PIM-3-Kinase und/oder eines Proteins gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b), 2d) oder 2f) und/oder eines zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Proteins und/oder eines Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder eines Proteins, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder deren Antisense Polynukleotide binden oder eines mindestens 10 (vorzugsweise 20) Aminosäuren langen Teilproteins eines der vorgenannten Proteine,
- e. eines Antikörpers gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),
- f. einer Zelle enthaltend eine Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e),

in einem Verfahren zur Auffindung schmerzregulierender Substanzen.

Dabei ist es für ein erfindungsgemäßes Arzneimittel, ein erfindungsgemäßes Diagnostikum und/oder eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn das Polynukleotid gemäß Punkt a) ein Polynukleotid kodierend für PIM1-Kinase oder ein Polynukleotid, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht, ist

und/oder

das Protein gemäß Punkt d) eine PIM-1-Kinase und/oder ein Protein gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d) oder 1f) und/oder ein zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Protein und/oder ein Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder ein Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder deren Antisense Polynukleotide binden oder ein mindestens 10 Aminosäuren langes Teilprotein eines der vorgenannten Proteine ist.

Dabei ist es für ein erfindungsgemäßes Polynukleotid (auch Anti-Sense etc.), ein erfindungsgemäßes Arzneimittel, ein erfindungsgemäßes Diagnostikum und/oder eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn das Polynukleotid (gegebenfalls gemäß Punkt a) und/oder Punkt b)) eine RNA oder eine ein- oder doppelsträngige DNA, insbesondere mRNA oder cDNA ist.

Dabei ist es für ein erfindungsgemäßes Polynukleotid (nicht Anti-Sense etc.), ein erfindungsgemäßes Arzneimittel, ein erfindungsgemäßes Diagnostikum und/oder eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn das Polynukleotid (gegebenfalls gemäß Punkt b)) Teil

eines Ribozyms oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA oder DNA ist.

5 Dabei ist es für einen erfindungsgemäßen Vektor, ein erfindungsgemäßes Arzneimittel, ein erfindungsgemäßes Diagnostikum und/oder eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn der Vektor (gegebenfalls gemäß Punkt c)) ein Expressionsvektor ist.

10 Dabei ist es weiter für einen erfindungsgemäßen Vektor, ein erfindungsgemäßes Arzneimittel, ein erfindungsgemäßes Diagnostikum und/oder eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn der Vektor (gegebenfalls gemäß Punkt c)) abgeleitet ist von einem Virus, beispielsweise dem Adenovirus, Adenoassoziiertem Virus oder Herpesvirus und/oder er mindestens eine LTR-, Poly A-, Promotor- und/oder ORI-  
15 Sequenz enthält.

Dabei ist es für ein erfindungsgemäßes Protein oder Teilprotein, ein erfindungsgemäßes Arzneimittel, ein erfindungsgemäßes Diagnostikum und/oder eine erfindungsgemäße Verwendung (nicht Gentherapie) besonders bevorzugt, wenn das Protein oder Teilprotein (gegebenfalls  
20 gemäß Punkt d)) posttranslational modifiziert wurde, es insbesondere glykosiliert, phosphoryliert, amidiert, methyliert, acetyliert, ADP-ribosyliert, hydroxyliert, mit einem Membrananker versehen, gespalten oder verkürzt wurde.

25 Dabei ist es für einen erfindungsgemäßen Antikörper (auch Anti-Sense etc.), ein erfindungsgemäßes Arzneimittel, ein erfindungsgemäßes Diagnostikum und/oder eine erfindungsgemäße Verwendung (nicht Gentherapie) besonders bevorzugt, wenn der Antikörper (gegebenenfalls  
30 gemäß Punkt e)) ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper ist.

Dabei ist es für eine erfindungsgemäße Zelle, ein erfindungsgemäßes Arzneimittel, ein erfindungsgemäßes Diagnostikum und/oder eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn es sich bei der Zelle (gegebenenfalls gemäß Punkt f)) um eine Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder eine immortalisierte oder native Säugetierzelle handelt.

Dabei ist es für eine erfindungsgemäße Verbindung (auch Anti-Sense etc.), ein erfindungsgemäßes Arzneimittel, ein erfindungsgemäßes Diagnostikum und/oder eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn es sich bei der Verbindung (gegebenenfalls gemäß Punkt g)) um eine niedermolekulare Verbindung handelt.

Dabei ist es für ein erfindungsgemäßes Arzneimittel, ein erfindungsgemäßes Diagnostikum und/oder eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn der genannte Wirkstoff gemäß Punkt h) ein niedermolekularer Wirkstoff ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Behandlung, insbesondere Schmerzbehandlung, eines nichthumanen Säugetieres oder Menschen, das oder der eine Behandlung von Schmerzen, insbesondere chronischer Schmerzen, benötigt, durch Verabreichung eines erfindungsgemäßen Arzneimittels, insbesondere solche enthaltend eine erfindungsgemäße Substanz und/oder einen erfindungsgemäßen Wirkstoff.

Die Verabreichung kann beispielsweise in Form eines Arzneimittels wie oben beschrieben erfolgen.

Insgesamt ist eine wichtige Grundlage der Erfindung die Identifizierung schmerzregulierter Gene und Genfragmente. Darauf basiert das Screeningverfahren. Aber auch die Verwendung zur Diagnose oder Therapie bietet sich wie bereits ausgeführt an. Im folgenden werden

entsprechende Anwendungsmöglichkeiten und weitere Ausführungsbeispiele erläutert.

## 1. Therapie chronischer Schmerzen

5 Die mRNA-Expression der Kinasen wurde durch in-situ-Hybridisierung im Rückenmarksgewebe untersucht. Im Rückenmark projizieren die primären sensorischen Neurone auf nachgeschaltete zentralnervöse Neurone, es handelt sich hierbei neben supraspinalen Vorgängen um die zentrale Umschaltstelle für nozizeptive Information. Zahlreiche Experimente konnten  
10 zeigen, daß der Entwicklung chronischer Schmerzzustände plastische Veränderungen des Nervensystems zugrundeliegen (als Überblick siehe Corderre et al., 1993; Zimmermann und Herdegen, 1996). Insbesondere in den Neuronen der dorsalen Wurzelganglien und des Rückenmarks sind plastische Veränderungen beschrieben worden, die mit der Regulation  
15 schmerzrelevanter Gene einhergeht. So ist für eine Reihe von Neurotransmitter-Rezeptoren, die für die Schmerztherapie von Bedeutung sind, eine Gen-Regulation im Rückenmark beschrieben worden (siehe Tabelle 1). Auf dieser Grundlage könnten die gefundenenen, unter Schmerz regulierten cDNA-Sequenzen zur Therapie (Gentherapie,  
20 Antisense, Ribozyme) und Diagnose chronischer Schmerzzustände verwendet werden.

### 1.1 Antisense-Strategien

Hierbei werden, abgeleitet von der Nukleinsäuresequenz der vollständigen  
25 cDNA oder von Teilbereichen Konstrukte erstellt, die die mRNA oder Proteinkonzentration herabsetzen können. Dies können z.B. antisense-Oligonukleotide (DNA oder RNA) sein, die eventuell unter Verwendung modifizierter Nukleotidbausteine ( z.B. O-Allyl-Ribose) eine erhöhte Stabilität gegenüber Nukleasen aufweisen. Zudem ist die Verwendung von  
30 Ribozymen denkbar, die als enzymatisch aktive RNA-Moleküle eine spezifische Spaltung der RNA katalysieren. Daneben könnten auch Vektoren eingesetzt werden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen oder

Teilbereiche dieser Nukleotidsequenzen unter Kontrolle eines geeigneten Promotors exprimieren und somit für eine in-vivo oder ex-vivo Therapie geeignet sind. Zusätzlich sind auch Antisense-Konstrukte möglich, die unter Austausch des Phosphatrückgrats von Nukleotidsequenzen (z.B. PNAs, d.h. Peptide Nucleic Acids) oder Verwendung nichttraditioneller Basen wie Inosine, Queosine oder Wybutosine sowohl wie Acetyl-, Methyl-, Thio- und ähnlich modifizierte Formen von Adenin, Cytidin, Guanosin u, Thymin und Uridin nicht oder in geringerem Masse durch endogene Nukleasen abgebaut werden können.

## **1.2. Antagonisten/ Agonisten bzw. Inhibitoren/Aktivatoren der im Screeningverfahren verwendeten erfindungsgemäßen Genprodukte.**

Dies umfaßt Substanzen, die durch eine Bindung an das Genprodukt dessen Funktion verändern. Dies können sein:

1.2.1. Organisch-chemische Moleküle, die im Rahmen eines Wirkstoffscreenings unter Verwendung der Genprodukte der erfindungsgemäßen cDNA als Bindungspartner gefunden werden.

1.2.2. Antikörper, seien es polyklonale, chimäre, single-chain, F<sub>ab</sub>-Fragmente oder Fragmente aus Phagen-Banken, die bevorzugt als neutralisierende Antikörper über eine Bindung an die Genprodukte spezifisch die Funktion beeinflussen.

1.2.3. Aptamere, d.h. Nukleinsäuren oder Nukleinsäurederivate mit Proteinbindenden Eigenschaften. Dazu gehören auch sog. Spiegelmere, die durch Spiegelevolution gewonnene spiegelbildliche und damit stabile Oligonukleotide darstellen, die hochaffin und hochspezifisch ein Zielmolekül binden können (Klußmann et al., 1996).

## **1.3. Gentherapie**

Die beschriebenen Sequenzen können zur Therapie neurologischer Erkrankungen insbesondere chronischer Schmerzzustände eingesetzt werden, indem sie nach Klonierung in geeignete Vektoren (z. B. Adenovirus-Vektoren oder adenö-assoziierter-Virus-Vektoren) zur in vivo

oder ex-vivo Therapie verwendet werden, um dort z.B. einer Überexpression oder Unterexpression des endogenen Genproduktes entgegenzusteuern, die Sequenz des defekten Genproduktes zu korrigieren (z. B. durch Transsplicing mit dem exogenen Konstrukt) oder ein funktionelles Genprodukt zur Verfügung zu stellen.

## 2. Diagnose

Polynukleotidsequenzen (Oligonukleotide, antisense -DNA & RNA-Moleküle, PNAs), die von den im Screeningverfahren etc. verwendeten Nukleotidsequenzen abgeleitet sind, könnten zur Diagnose von Zuständen oder Erkrankungen eingesetzt werden, die mit einer Expression dieser Gensequenzen assoziiert sind. Beispiele dieser Zustände oder Erkrankungen beinhalten neurologische Erkrankungen inklusive chronischer Schmerzen oder neuropathischer Schmerzen (hervorgerufen z.B. durch Diabetes, Krebs oder AIDS) oder neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson, Chorea Huntington, Jacob-Creutzfeld, amyotrophe Lateralsklerose und Demenzen. Die Nukleotidsequenzen könne auf vielfältige Weise (Northernblot, Southernblot, FISH-Analyse, PRINS-Analyse, PCR) entweder zur Identifizierung der Genproduktes oder abweichender diagnostisch relevanter Genprodukte oder zur Quantifizierung des Genproduktes dienen. Neben der Nukleinsäurediagnostik können auch Antikörper oder Aptamere gegen das von den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren kodierte Protein zur Diagnostik eingesetzt werden (z. B. mittels ELISA, RIA, immuncytochemische oder immunhistochemische Verfahren), um das Protein oder abweichende Formen zu identifizieren und das Protein zu quantifizieren.

Im Hinblick auf eine Gendiagnostik könnten Nukleinsäure-Sonden abgeleitet von den erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen zur



Bestimmung des Gen-Lokus eingesetzt werden (z.B. durch FISH, FACS, artifizielle Chromosomen wie YACs, BACs oder P1-Konstrukte).

5

Die folgenden Beispiele und Abbildungen sollen die Erfindung erläutern, ohne sie darauf zu beschränken.

10

### Abbildungen und Beispiele

#### 15 Abbildungen:

- Fig. 1a) cDNA-Sequenz von PIM1-Kinase, human; AN: NM\_002648
- Fig. 1b) Aminosäure-Sequenz von PIM1-Kinase, human; AN: NP\_002639
- 20 Fig. 1c) cDNA-Sequenz von PIM1-Kinase, Ratte; AN: NM\_017034
- Fig. 1d) Aminosäure-Sequenz von PIM1-Kinase, Ratte; AN: NP\_058730
- Fig. 1e) cDNA-Sequenz von PIM1-Kinase, Maus; AN: NM\_008842
- Fig. 1f) Aminosäure-Sequenz von PIM1-Kinase, Maus; AN: NP\_032868
- Fig. 2a) cDNA-Sequenz von PIM3-Kinase, human; AN:
- 25 Fig. 2b) Aminosäure-Sequenz von PIM3-Kinase, human; AN:
- Fig. 2c) cDNA-Sequenz von PIM3-Kinase, Ratte; AN: NM\_022602
- Fig. 2d) Aminosäure-Sequenz von PIM3-Kinase, Ratte; AN: NM\_072124
- Fig. 2e) cDNA-Sequenz von PIM3-Kinase, Maus; AN:
- Fig. 2f) Aminosäure-Sequenz von PIM3-Kinase, Maus; AN:
- 30 Fig. 3) mRNA-Expression der PIM-Kinasen im Lumbalmark der adulten Ratte. s. Beispiel 1a)
- Fig. 4) Veränderungen der PIM-1 Genexpression im Rückenmark (L5) nach Ischiadicus-Ligatur (Bennett); s. Beispiel 1b)
- 35 Fig. 5) PIM-1 mRNA-Spiegel im Lumbalmark (L5) nach Bennett-Ligatur  
Quantitative Auswertung der *in situ*-Hybridisierungsergebnisse
- Fig. 6) mRNA-Expressionsmuster der PIM-Kinasen im Hinterhorn des Rückenmarks.
- Fig. 7) mRNA-Expression der PIM-Kinasen im Spinalganglion
- 40 Fig. 8) Lokalisation der PIM-1 Genexpression im Spinalganglion (L6) der Ratte mit *in situ*-Hybridisierung

Fig. 9) Veränderungen der PIM-1, PIM-2 und PIM-3 mRNA-Spiegel im Spinalganglion L6 nach bilateraler CFA-Arthritis  
 Densitometrische Analyse der Ethidiumbromid-gefärbten Banden für PIM-1, PIM-2, PIM-3 und GAPDH nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte (25 Zyklen).  
 Darstellung der Meßwerte als Quotient aus PIM-1 und GAPDH bzw. PIM-2/GAPDH bzw. PIM-3/GAPDH

### Beispiele:

#### Beispiel 1 Identifizierung schmerzregulierter Gene

Es wurde folgendes Vorgehen gewählt:

Als Ausgangspunkt für die Isolierung schmerzregulierter Gene wurde das sogenannte Formalinmodell an der Ratte gewählt, bei dem Formalin in die Rattenpfote injiziert wird. Das Zielgewebe, in dem die schmerzregulierte Expression der erfindungsgemäßen Gene nachgewiesen wurde, war der dorsale Teil des Rückenmarks der Ratte in den Segmenten L3-L6.

**Tiermodell:** Der Formalin-Test stellt ein geeignetes Modell für den Bereich des inflammatorischen/persistenten Schmerz dar (Duibisson et al., 1997). Hierbei wurde 50µl 5%ige Formalinlösung unilaterial in die Hinterpfote adulter Wistar-Ratten injiziert und die Tiere 24Std. nach der Injektion zur Gewebeentnahme getötet. Parallel wurden bei den Kontrolltieren isotonische Kochsalzlösung in die Hinterpfote injiziert.

**Gewebeentnahme.** Die Tier werden dekapitiert, die Rückenwirbelsäule herauspräpariert, Schnitte des Rückenmarks angefertigt

und mit spezifischen markierten Antikörpern gegen die PIM-Kinasen hybridisiert.

5 **Beispiel 1a) zu Fig. 3)**

Digitalisierte Röntgenfilmautoradiogramme von Gefrierschnitten durch das Rückenmark (Ebene L5) nach *in situ*-Hybridisierung mit spezifischen <sup>35</sup>S-markierten RNA-Sonden. Die Expositionszeit der Röntgenfilme betrug 72h. PIM-1 ist unter normalen Bedingungen relativ gering exprimiert (A). Im Vergleich dazu ist PIM-2 konstitutiv stark exprimiert (B) mit deutlicher Dominanz in der grauen Substanz (vor allem im oberflächlichen Hinterhorn und in den Motoneuronen des Vorderhorns). PIM-3 mRNA ist über den ganzen Schnitt verteilt (C), mit stärkeren Signalen über den neuronalen Bereichen und schwachen Signalen über der weißen Substanz.

15

**Beispiel 1b) zu Fig. 4**

Vestärkte PIM-1 Genexpression im Rückenmark nach Ischiadicus-Ligatur. Digitalisierte Gefrierschnitte durch das Lumbalmark von Tieren 7 Tage nach Bennett-Ligatur (B) zeigen nach Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten PIM-1 Sonde eine deutliche Erhöhung der PIM-1 mRNA-Spiegel Rückenmarkshälfte ipsilateral zur Ligation (Pfeil), sowohl im Hinterhorn als auch im Vorderhorn. In Sham-operierten Tieren (A) wird diese Erhöhung nicht beobachtet

20

25 **Beispiel 1c) zu Fig. 5**

Semi-quantitative Analyse der PIM-1 mRNA Spiegel in den verschiedenen Rückenmarksregionen von Sham-operierten Tieren und von Tieren 7 Tage nach Bennett-Ligatur.

Nach Digitalisierung der mit einer PIM-1 spezifischen Sonde hybridisierten Gefrierschnitte (MCID Bildanalyse-System, Imaging Research, Canada) werden die radioaktiven Hybridisierungssignale densitometrisch erfaßt.

30

Die Meßwerte werden nach Etablierung einer Standardkurve in nCi/g Gewebe umgewandelt.

Für die Etablierung einer Standardkurve werden Objektträger mit  $^{14}\text{C}$ -Plastikstreifen mit definiertem radioaktiven Gehalt (American Radiolabeled Chemical Inc.) gemeinsam mit den hybridisierten Schnitten auf Röntgenfilm für die gleiche Dauer exponiert.

Analysiert wurden jeweils die kontra- und ipsilaterale Regionen des Hinterhorns sowie des Vorderhorns.

Für die Gruppe der Sham-operierten Tiere wurden pro Region 9 Messungen, für die Gruppe nach Bennett-Ligatur 17 Messungen durchgeführt.

#### **Beispiel 1d) zu Fig. 6**

Hochauflösende Dunkelfeldaufnahmen des oberflächlichen Hinterhorns ipsilateral zur Ischiadicus-Ligatur nach Hybridisierung mit PIM-spezifischen Sonden (A,C, E) und Gegenfärbung mit Kresylviolett (B,D,F). PIM-1 hybridisierte Schnitte zeigen eine "layer"-spezifische Expression von PIM-1 in Lamina 2 und 3 (A,B). PIM-2 Transkripte sind besonders in Lamina 1 und Lamina und im gesamten Hinterhorn relativ stark exprimiert (D,E). Hingegen ist PIM-3 weniger im oberflächlichen Hinterhorn, sondern in Lamina 3 und den tieferen Schichten exprimiert (E,F).

#### **Beispiel 1e) zu Fig. 7**

Digitalisierte Röntgenfilmautoradiogramme von Gefrierschnitten durch ein lumbales Spinalganglion (L6) nach *in situ*-Hybridisierung mit spezifischen  $^{35}\text{S}$ -markierten RNA-Sonden. Die Expositionszeit der Röntgenfilme betrug 72h.

Alle drei PIM-Kinasen sind unter normalen Bedingungen im Spinalganglion exprimiert (A,C,D). Sonden in sense-Orientierung, hier am Beispiel für PIM-1 gezeigt (B), produzieren keine spezifischen Hybridisierungssignale. PIM-3 ist im Vergleich stärker exprimiert (D).

Für die RT-PCR- Analyse wurden die Spinalganglien (L6) aus 5  
Kontrolltieren beiderseits entnommen und für die Extraktion der Gesamt-  
RNA gepoolt. Für die RNA-Extraktion wurde Trizol (Gibco-BRL) verwendet.  
Vor Durchführung der reversen Transkription wurde eine Dnase I-  
5 Behandlung durchgeführt.

Für die reverse Transkription mit Superscript II (Gibco-BRL) wurden 2,5 µg  
der isolierten Gesamt-RNA in einer 50 µl-Reaktion eingesetzt.

Die PCR-Amplifikation wurde in einem Thermocycler 9700 (Perkin Elmer)  
nach folgendem Programm durchgeführt:

10 1 Zyklus 95°C, 3 min; 40 Zyklen (94°C, 45 sec; 60°C, 45 sec; 72°C, 60  
sec); 1 Zyklus 72°C, 7 min.

Als Matrize wurde jeweils 7,5 µl der cDNA eingesetzt (50 ng/µl).

Die spezifischen Amplicons für PIM-2 ( 518 bp) und PIM-3 (612 bp) hatten  
die erwarteten Größen; GAPDH. Als Negativ-Kontrollen wurden RT-  
15 Reaktionen unter Weglassen der reversen Transkriptase durchgeführt.

#### **Beispiel 1f) zu Fig. 8**

Hybridisierung von Gefrierschnitten mit PIM-1 spezifischen Sonden zeigt  
spezifische Hybridisierungssignale über den zellreichen Regionen des  
20 Spinalganglions (Dunkelfeld aufnahme in A). Die mikroskopische  
Hochauflösung im Hellfeld bestätigt, daß die Signale in den Kresylviolett  
gegengefärbten Schnitten primär über den neuronalen Zellen lokalisiert  
sind (B).

#### **Beispiel 1g) zu Fig. 9**

25 Aus 5 Tieren wurden beiderseits die Spinalganglien (L6) entnommen und  
für die Extraktion der Gesamt-RNA gepoolt.

Für die RNA-Extraktion wurde Trizol (Gibco-BRL) verwendet. Vor  
Durchführung der reversen Transkription wurde eine Dnase I-Behandlung  
30 durchgeführt.

Für die reverse Transkription mit Superscript II (Gibco-BRL) wurden 2,5 µg der isolierten Gesamt-RNA in einer 50 µl-Reaktion eingesetzt.

Die PCR-Amplifikation wurde in einem Thermocycler 9700 (Perkin Elmer) nach folgendem Programm durchgeführt:

- 5     1 cycle 95°C, 3 min; 40 cycles (94°C, 45 sec; 60°C, 45 sec; 72°C, 60 sec);  
1 cycle 72°C, 7 min.

Als Matrize wurde jeweils 7,5 µl der cDNA eingesetzt (50 ng/µl).

- 10    Nach 10, 15, 20, 25, 30, 35 und 40 Zyklen wurden jeweils 10 µl der PCR-Reaktion entnommen und gelelektrophoretisch aufgetrennt, um den linearen Bereich der Amplifikation zu bestimmen. Die Ethidiumbromid-gefärbten Gele wurden digitalisiert und die PCR-Banden densitometrisch gemessen.

Die spezifischen Amplicons hatten die erwarteten Größen (PIM-1, 550 bp; PIM-2, 518 bp; PIM-3, 612 bp; GAPDH, 227 bp).

- 15    Um die Veränderung der PIM-Expression nach CFA zu erfassen, wurden die Quotienten aus den spezifischen Amplicons (PIM-1, PIM-2, PIM-3) und dem nicht regulierten GAPDH für jede Versuchsgruppe gebildet.

### **Beispiel 2:**

- 20    **Durchführung des Screeningverfahrens mit Messung der Bindung über die Verdrängung eines radioaktiv markierten Liganden**

- Ein Nukleinsäureabschnitt, der für die PIM1-Kinase kodiert, wird in einem Expressionsvektor kloniert, der eine konstitutive Expression (z.B. CMV-Promoter) oder eine induzierbare Expression in eukaryonten Zellen erlaubt.  
25    Die DNA wird mit geeignetem Transfektionsverfahren, z.B. mit Lipofectamin (Fa. Roche Diagnostics) in eukaryontischen Zellen (z.B. CHO-Zellen, HEK293-Zellen oder NIH-3T3-Zellen) hineingebracht. Die Zellen werden in Anwesenheit eines Selektionsreagenzen (z.B. Zeocin, Hygromycin oder  
30    Neomycin) kultiviert so daß nur die Zellen überleben, die das DNA-

Konstrukt aufgenommen haben, und bei länger andauernder Selektion, auch in das Genom inkorporiert haben.

Ausgehend von diesen Zellen werden Membranfraktionen gewonnen, die die PIM1-Kinase in großer Menge enthalten und für einen Bindungsassay verwendet werden können. Dieser besteht aus 1.) dem PIM1-Kinase enthaltenden Membranen 2.) einem radioaktiv markierten Liganden 3.) einem Bindungspuffer (z.B. 50 mM HEPES pH 7.4, 1 mM EDTA) und dem auf Bindung zu untersuchenden Liganden. Nach Inkubation der oben genannten Reaktionsgemische (für z.B. 30-60 min) bei einer geeigneten Temperatur (meistens Raumtemperatur) werden die nichtgebundenen radioaktiven Ligandenmoleküle abfiltriert. Die Restmenge an gebundenem Liganden wird nach Zugabe eines Szintillationscocktails in einem  $\beta$ -Counter (z.B. Trilux, Fa. Wallac) vermessen. Zeigt die Testsubstanz eine Bindung an die PIM1-Kinase, so wird dies als verringerter radioaktiver Einbau detektiert. Dieses Verfahren wird geeignetermaßen so miniaturisiert, daß es in (96-, 384- oder 1536-well) Mikrotiterplatten durchgeführt werden kann, um dieses Verfahren mittels eines Roboters im sogenannten Highthroughput-Screening (HTS)-Verfahren durchzuführen.

### **Beispiel 3:**

#### **Durchführung des erfindungsgemäßen Screeningverfahrens mit Messung der durch die Bindung der Substanz veränderten funktionellen Parameter**

Ein Nukleinsäureabschnitt, der für die Proteinkinase PIM-1 kodiert, wird in einem Expressionsvektor kloniert, der eine induzierbare Expression in Prokaryonten, wie z.B. E.coli erlaubt. Hierbei wird der Nukleinsäureabschnitt so modifiziert, daß er als Fusionsprotein mit einer zusätzlichen N- oder C-terminalen Aminosäuresequenz exprimiert wird. Diese Sequenz sollte bei unveränderter Funktion der PIM-1 Kinase eine Aufreinigung über ein spezifisches Verfahren erlauben, z.B. Glutathion S-

Transferasefragment, das über Bindung an Glutathion eine Isolierung aus dem Proteingemisch erlaubt. Nach Transfektion der Bakterien, Induktion des Genes (z.B. mit IPTG beim lac-Promoter) und Aufschließen der Bakterien werden die Fusionsproteine aufgereinigt und in einem in vitro-Kinase Experiment eingesetzt. Hierbei werden 5 µg Protein bei 30°C für 30 Minuten in 50 µl Kinasepuffer (20 mM PIPES, pH 7.0, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 7 mM β-Mercaptoethanol, 0.4 mM Spermin, 10 mM rATP) ergänzt mit 10 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP. Als Substrate werden gereinigtes Histon H1-Protein (Fa. Sigma) oder bakteriell exprimiertes GST-NFATc1-Fusionsprotein hinzugegeben. Nach der Inkubationszeit wird das nicht-inkorpierte [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP abfiltriert und die Menge an eingebautem <sup>32</sup>Phosphat durch β-Szintillation (Trilux, Fa. Wallac) bestimmt. In einem Experiment zum Aufspüren neuer PIM-1 Kinase-Inhibitoren werden in diesem Ansatz die Testsubstanzen mitinkubiert und eine Abnahme der <sup>32</sup>P-Inkorporation als Indikator für einen Inhibitor benutzt. Dieses Verfahren wird geeigneter-maßen so miniaturisiert, daß es in (96-, 384- oder 1536-well) Mikrotiterplatten durchgeführt werden kann, um dieses Verfahren mittels eines Roboters im sogenannten Highthroughput-Screening (HTS)-Verfahren durchzuführen.

#### Beispiel 4:

##### Beispiel für ein Arzneimittel enthaltend eine erfindungsgemäße Verbindung - Tablettenformulierung

Tabletten können durch direktes Verpressen von Mischungen der erfindungsgemäßen Verbindung mit entsprechenden Hilfsstoffen oder durch Verpressen von verbindungshaltigen Granulaten (mit gegebenenfalls weiteren Hilfsstoffen) hergestellt werden. Die Granulate können dabei entweder durch Feuchtgranulation mit z.B. wäßrigen Granulierflüssigkeiten und anschließender Trocknung dieser Granulate oder durch Trockengranulation z.B. über Kompaktierung hergestellt werden.



### Direktverpressung

z.B. pro Tablette:	25 mg	erfindungsgemäße Verbindung
	271 mg	Ludipress™ (Granulat zur Direktablettierung aus Lactose monohydrat, Povidon K30 und Crospovidon)
	4 mg	Magnesiumstearat
	300 mg	Gesamt

Homogene Mischung des Wirkstoffes mit den Hilfsstoffen herstellen und diese auf einer Tablettenpresse zu Tabletten mit einem Ø von 10 mm verpressen.

### Trockengranulation

z.B. pro Tablette:	25 mg	erfindungsgemäße Verbindung
	166 mg	Microcristalline Cellulose
	80 mg	Niedrig substituierte Hydroxypropylcellulose (I-HPC LH 11™)
	5 mg	Hochdisperses Siliziumdioxid
	4 mg	Magnesiumstearat
	280 mg	Gesamt

Homogene Mischung der Verbindung mit der Mikrokristallinen Cellulose und der I-HPC herstellen und diese Kopaktieren. Nach dem Sieben der Komprimat wird das entstandene Granulat mit Magnesiumstearat und Siliziumdioxid gemischt und auf einer Tablettenpresse zu Tabletten mit einem Ø von 9 mm verpreßt.

▪ Feuchtgranulation

z.B. pro Tablette:	25 mg	erfindungsgemäße Verbindung
	205 mg	Mikrokristalline Cellulose
	6 mg	Povidon K30
	10 mg	Crospovidon
	4 mg	Magnesiumstearat
	250 mg	Gesamt

Homogene Mischung der Verbindung mit der Mikrokristallinen Cellulose und dem Crospovidon herstellen und diese in einem Granulator mit einer wäßrigen Lösung des Povidons granulieren. Das feuchte Granulat wird anschließend nachgranuliert und nach der Trocknung im Trockenschrank (50°C) 10 h getrocknet. Das trockene Granulat wird mit dem Magnesiumstearat zusammen gesiebt, endgemischt und auf einer Tablettenpresse zu Tabletten mit einem Ø von 8 mm verpreßt.

**Beispiel 5:**

**Beispiel für ein Arzneimittel enthaltend eine erfindungsgemäße Verbindung – parenterale Lösung**

1 g einer erfindungsgemäßen Verbindung wird in 1 l Wasser für Injektionszwecke bei Raumtemperatur gelöst und anschließend durch Zugabe von NaCl (Natriumchlorid) auf isotone Bedingungen eingestellt.

**Literatur:**

- Akopian AN, Sivilotti L & Wood JN (1995) *Nature* 379: 257-262
- 5 Ausubel FM, Brent R, Kingdon RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA & Struhl K eds.(1990) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc. New York, NY.
- Baba H, Doubell TP, Woolf CJ 1999: Peripheral inflammation facilitates A $\beta$  fiber-mediated synaptic input to the substantia gelatinosa of the adult rat spinal cord. *J Neurosci* 19: 859-867
- 10 Bauer D, Müller H, Reich J, Riedel H, Ahrenkiel V, Warthoe P & Strauss M (1993): Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR) *Nucl Acids Res* 21: 4272-4280.
- Bonini A, Anderson SM, Steiner DF (1997) Molecular cloning and tissue expression of a novel orphan G Protein-coupled receptor from rat lung. *Biochem Biophys Res Comm* 234: 190-193.
- 15 Chih-Cheng et al., (1995): A P2X prinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 377:428-432
- Corderre TJ, Katz J, Vaccarino AL, Melzack R (1993): Contribution of central plasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain* 52: 259-285.
- 20 Dickenson (1995) Novel pharmacological targets in the treatment of pain. *Pain Rev.*, 2, 1-12.
- Dubuisson et al., 1997 *Pain*, 4:161-174.
- Feng Y & Gregor P (1997) Cloning of a novel member of the G Protein-coupled receptor family related to peptide receptors. *Biochem Biophys Res Comm* 231: 651-654.
- 25 Furukawa T, Yang Y, Nakamoto B, Stamatoyannopoulos G, Papayannopoulou T (1996): Identification of new genes expressed in a human erythroleukemia cell line. *Bloods Cell Mol & Dis* 22:11-22.

- Gunasekar PG, Kanthasamy, AG, Borowitz JL, Isom GE 1995: NMDA receptor activation produces concurrent generation of nitric oxide and reactive oxygen species: implication for cell death. *J Neurochem* 65: 2016-2021.
- 5 Hawes BE, Fried S, Yao X, Weig B, Graziano MP 1998: Nociceptin (ORL1) and  $\mu$ -Opioid receptors mediate mitogen-activated protein kinase activation in CHO cells through a Gi-coupled signaling pathway: evidence for distinct mechanisms of agonist-mediated desensitization. *J Neurochem* 71: 1024-1033.
- 10 Hubank M & Schatz DG (1994): Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucl Acids Res* 22: 5640-5648.
- Klußmann S et al., 1996: *Nature Biotechnology* 14: 1112-1115.
- Li L-Y & Chang K-J 1996: The stimulatory effect of opioids on mitogen-activated protein kinase in chinese hamster ovary cells transfected to express  $\mu$ -opioid receptors. *Mol Pharm* 50:599-602.
- 15 Liang P & Pardee AB 1992: Differential Display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257:967-971.
- Methner A, Hermey G, Schinke B, Hermanns-Borgmeyer I (1997): A novel G Protein-coupled receptor with homology to neuropeptide and chemoattractant receptors expressed during bone development. *Biochem Biophys Res Comm* 233: 336-342.
- 20 Mohit AA, Martin JH & Miller CA 1995: p493F12 Kinase: a novel MAP kinase expressed in a subset of neurons in the human nervous system. *Neuron* 14: 67-78.
- 25 Poirier GM-C, Pyati J, Wan JS, Erlander MG 1997: Screening differentially expressed cDNA clones obtained by differential display using amplified RNA. *Nucleic Acids Research* 25: 913-914.

Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T 1989: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Sompayrac L, Jane S, Burn TC, Tenen DG & Danna KJ 1995: Overcoming limitations of the mRNA differential display technique. Nucleic Acids Research 23: 4738-4739.

Tal M 1996: A novel antioxidant alleviates heat hyperalgesia in rats with an experimental painful neuropathy. Neurreport 7: 1382-1384.

Tölle TR (1997): Chronischer Schmerz. In: Klinische Neurobiologie, Herdergen T, Tölle TR, Bähr M (Hrsg.): S. 307-336; Spektrum Verlag, Heidelberg.

U.S.Patent 5.262.311

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW (1995): Serial analysis of gene expression. Science 270: 484-487.

Wan JS, Sharp JS et al. (1996): Cloning differentially expressed mRNAs Nature Biotech 14:1685-1691.

Watson JB & Margulies JE (1993) Differential cDNA screening strategies to identify novel stage-specific proteins in the developing mammalian brain. Dev Neurosci 15: 77-86.

Wilks AF (1989) Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci USA 86: 1603-1607.

Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE 1992: Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. Nature 355:75-78.

Zimmermann, M & Herdegen, T (1996): Plasticity of the nervous system at the systemic, cellular and molecular levels: a mechanism of chronic pain and hyperalgesia. Progr Brain Res 110: 233-259

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Auffindung schmerzregulierender Substanzen mit  
folgenden Verfahrensschritten:

(b) Inkubation einer zu testenden Substanz unter geeigneten Bedingungen mit einer Zelle und/oder einer Präparation aus einer solchen Zelle, die das Protein PIM-1-Kinase oder PIM-3-Kinase und/oder ein Protein gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b), 2d) oder 2f) und/oder ein zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Protein und/oder ein Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder ein Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder deren Antisense Polynukleotide binden, oder ein mindestens 10 Aminosäuren langes Teilprotein eines der vorgenannten Proteine synthetisiert hat,

(c) Messung der Bindung der Testsubstanz an dem von der Zelle synthetisierten Protein oder Teilprotein oder Messung mindestens eines der durch die Bindung der Testsubstanz an das Protein oder Teilprotein veränderten funktionellen Parameter.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle vor dem Schritt (a) gentechnisch manipuliert wird.

3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die gentechnische Manipulation die Messung mindestens eines der durch die Testsubstanz veränderten funktionellen Parameter erlaubt.
- 5 4. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß durch die gentechnische Manipulation eine in der Zelle nicht endogen exprimierte Form eines G-Proteins exprimiert oder ein Reporterogen eingeführt wird.
- 10 5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2-4, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle gentechnisch so manipuliert wird, daß die Zelle mindestens ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid enthält.
- 15 6. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Polynukleotid in einem rekombinanten DNA-Konstrukt enthalten ist.
- 20 7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle nach der gentechnischen Manipulation gemäß Anspruch 2 und vor dem Schritt (a) gemäß Anspruch 1 unter Bedingungen, die eine Expression erlauben, kultiviert wird, gegebenenfalls unter Selektionsdruck.
- 25 8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder eine immortalisierte oder native Säugetierzelle ist.
- 30 9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Messung der Bindung über die Verdrängung eines bekannten markierten Liganden des Teilproteins oder Proteins

und/oder über die daran gebundene Aktivität einer markierten Testsubstanz erfolgt.

5 10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8; dadurch gekennzeichnet, daß die Messung mindestens eines der durch die Testsubstanz veränderten funktionellen Parameter über Messung der Regulation, Hemmung und/oder Aktivierung von Rezeptoren, Ionenkanälen und/oder Enzymen erfolgt, insbesondere über Messung  
10 der Veränderung der Genexpression, des Ionenmilieus, des pH oder des Membranpotentials, über Veränderung der Enzymaktivität oder der Konzentration der 2<sup>nd</sup> messenger.

11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein oder Teilprotein in den Schritten (a) und (b) ausgewählt ist aus:  
15

- der PIM-1-Kinase,
- einem Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder ein dazu zu mindestens 90 %, vorzugsweise 95%, insbesondere 97%, ähnliches Polynukleotid kodiert,  
20
- einem Protein mit einer Aminosäuresequenz gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), oder einem dazu zu mindestens 90 %, vorzugsweise 95%, insbesondere 97%, ähnlichem Protein und/oder
- einem Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder deren Antisense Polynukleotide bindet,  
25
- oder einem mindestens 10 Aminosäuren langen Teilprotein eines der vorgenannten Proteine.  
30



12. Polynukleotid, welches einer der in einer der Abbildungen 2a) und 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht.
- 5 13. Polynukleotid, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um ein Antisense Polynukleotid oder PNA handelt, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an ein Polynukleotid gemäß Anspruch 12 zu binden.
- 10 14. Vektor enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 12 oder 13.
- 15 15. Protein kodiert durch ein Polynukleotid gemäß Anspruch 12.
- 16 16. Protein, für das ein Polynukleotid kodiert, daß unter stringenten Bedingungen mit einem der Polynukleotide gemäß Abbildung 2a) oder 2e) oder deren Antisense-Polynukleotid hybridisiert.
- 20 17. Protein, welches einer der in einer der Abbildungen 2b) oder 2f) dargestellten Aminosäuresequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht.
- 25 18. Antikörper gegen ein Peptid oder Protein gemäß einem der Ansprüche 15 – 17.
- 30 19. Zelle enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 12 oder 13, ein Peptid oder Protein gemäß einem der Ansprüche 15 – 17 und/oder einen Vektor gemäß Anspruch 14.
20. Transgenes nichthumanes Säugetier, dessen Keim- und somatische Zellen eine Nukleotidsequenz gemäß einem der Ansprüche 12 oder 13 als Resultat einer chromosomalen Einbringung in das Genom des

Tieres oder das Genom eines der Vorfahren des genannten Tieres enthalten.

- 5 21. Transgenes nichthumanes Säugetier, dessen Keim- und somatische Zellen als Resultat einer chromosomalen Manipulation im Genom des Tieres oder im Genom eines der Vorfahren des genannten Tieres eine der Nukleotidsequenzen gemäß Anspruch 12 nicht mehr in exprimierbarer Form enthalten.
- 10 22. Transgenes nichthumanes Säugetier gemäß einem der Ansprüche 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Nagetier ist.
23. Verbindung identifizierbar als schmerzregulierende Substanz durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-11.
- 15 24. Verbindung gemäß Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung durch ein Verfahren gemäß Anspruch 11 als schmerzregulierende Substanz identifizierbar ist.
- 20 25. Arzneimittel enthaltend mindestens
  - a. ein Polynukleotid kodierend für PIM1- Kinase oder PIM3- Kinase oder ein Polynukleotid, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
  - 25 b. ein Polynukleotid, insbesondere Antisense Polynukleotid oder PNA, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
  - 30 c. einen Vektor enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b)

- 5 d. eine PIM-1-Kinase oder PIM-3-Kinase und/oder ein Protein gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b), 2d) oder 2f) und/oder ein zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Protein und/oder ein Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder ein Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder deren Antisense Polynukleotide binden oder ein mindestens 10 Aminosäuren langes Teilprotein eines der vorgenannten Proteine,
- 10 e. einen Antikörper gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),
- 15 f. eine Zelle enthaltend eine Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e)
- 20 g. eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 23 oder 24 und/oder
- h. einen Wirkstoff, der an ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt a) bindet,
- 25 sowie gegebenenfalls geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.
26. Diagnostikum enthaltend mindestens
- 30 a. ein Polynukleotid kodierend für PIM1- Kinase oder PIM3- Kinase oder ein Polynukleotid, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten

Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,

- b. ein Polynukleotid, insbesondere Antisense Polynukleotid oder PNA, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- c. einen Vektor enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b)
- d. eine PIM-1-Kinase oder PIM-3-Kinase und/oder ein Protein gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b), 2d) oder 2f) und/oder ein zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Protein und/oder ein Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder ein Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder deren Antisense Polynukleotide binden oder ein mindestens 10 Aminosäuren langes Teilprotein eines der vorgenannten Proteine,
- e. einen Antikörper gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),
- f. eine Zelle enthaltend eine Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e)
- g. eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 23 oder 24 und/oder
- h. einen Wirkstoff, der an ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt a) bindet,

sowie gegebenenfalls geeignete Zusatzstoffe.

## 27. Verwendung

- 5 a. eines Polynukleotids kodierend für PIM1- Kinase oder PIM3- Kinase oder eines Polynukleotids, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
- 10 b. eines Polynukleotids, insbesondere Antisense Polynukleotid oder PNA, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der  
15 Punkte a) oder b)
- d. einer PIM-1-Kinase oder PIM-3-Kinase und/oder eines Proteins gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b), 2d) oder 2f) und/oder eines zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Proteins und/oder  
20 eines Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder eines Proteins, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß  
25 einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder deren Antisense Polynukleotide binden oder eines mindestens 10 Aminosäuren langen Teilproteins eines der vorgenannten Proteine,
- e. eines Antikörpers gegen eines der Proteine oder Teilproteine  
30 gemäß Punkt d),
- f. einer Zelle enthaltend eine Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein

oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e)

- g. einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 23 oder 24 und/oder
- h. eines Wirkstoffs, der an ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt a) bindet,

zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Schmerz.

28. Verwendung gemäß Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, daß die Behandlung chronischen, insbesondere neuropathischen oder entzündungsbedingten Schmerz betrifft.

29. Verwendung

- a. eines Polynukleotids kodierend für PIM1- Kinase oder PIM3- Kinase oder eines Polynukleotids, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
- b. eines Polynukleotids, insbesondere Antisense Polynukleotid oder PNA, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b)
- f. einer Zelle enthaltend eine Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b) oder einen Vektor gemäß Punkt c)

für die Gentherapie.

30. Verwendung gemäß Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um In-vivo oder In-vitro Gentherapie handelt.

31. Verwendung

5

a. eines Polynukleotids kodierend für PIM1- Kinase oder PIM3- Kinase oder eines Polynukleotids, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,

10

b. eines Polynukleotids, insbesondere Antisense Polynukleotid oder PNA, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,

15

c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b)

d. einer PIM-1-Kinase oder PIM-3-Kinase und/oder eines Proteins gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b), 2d) oder 2f) und/oder eines zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Proteins und/oder eines Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder eines Proteins, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder deren Antisense Polynukleotide binden oder eines mindestens 10 Aminosäuren langen Teilproteins eines der vorgenannten Proteine,

20

25

30

e. eines Antikörpers gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),

- f. einer Zelle enthaltend eine Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e)
  - 5 g. einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 23 oder 24 und/oder
  - h. eines Wirkstoffs, der an ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt a) bindet,
- 10 für die Diagnostik und/oder für Wirksamkeitsuntersuchungen.

### 32. Verwendung

- 15 a. eines Polynukleotids kodierend für PIM1- Kinase oder PIM3-Kinase oder eines Polynukleotids, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
- 20 b. eines Polynukleotids, insbesondere Antisense Polynukleotid oder PNA, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b)
- 25 d. einer PIM-1-Kinase oder PIM-3-Kinase und/oder eines Proteins gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b), 2d) oder 2f) und/oder eines zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Proteins und/oder eines Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert,
- 30 und/oder eines Proteins, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder deren



- Antisense Polynukleotide binden oder eines mindestens 10 Aminosäuren langen Teilproteins eines der vorgenannten Proteine,
- e. eines Antikörpers gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),
  - 5 f. einer Zelle enthaltend eine Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e)

in einem Verfahren zur Auffindung schmerzregulierender Substanzen.

10

- 33. Arzneimittel gemäß Anspruch 25, Diagnostikum gemäß Anspruch 26, Verwendung gemäß einem der Ansprüche 27, 29, 31 und/oder 32, dadurch gekennzeichnet, daß das Polynukleotid gemäß Punkt a) ein Polynukleotid kodierend für PIM1-Kinase oder ein Polynukleotid, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht, ist

15

und/oder

20

das Protein gemäß Punkt d) eine PIM-1-Kinase und/oder ein Protein gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d) oder 1f) und/oder ein zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Protein und/oder ein Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder ein Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder deren Antisense Polynukleotide binden oder ein mindestens 10 Aminosäuren langes Teilprotein eines der vorgenannten Proteine ist.

25

30

- 5 34. Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 12 oder 13, Arzneimittel gemäß Anspruch 25, Diagnostikum gemäß Anspruch 26, Verwendung gemäß einem der Ansprüche 27, 29, 31 und/oder 32, dadurch gekennzeichnet, daß das Polynukleotid (gegebenfalls gemäß Punkt a) und/oder Punkt b)) eine RNA oder eine ein- oder doppelstängige DNA, insbesondere mRNA oder cDNA ist.
- 10 35. Polynukleotid gemäß Anspruch 13, Arzneimittel gemäß Anspruch 25, Diagnostikum gemäß Anspruch 26, Verwendung gemäß einem der Ansprüche 27, 29, 31 und/oder 32, dadurch gekennzeichnet, daß das Polynukleotid (gegebenfalls gemäß Punkt b)) Teil eines Ribozyms oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA oder DNA ist.
- 15 36. Vektor gemäß Anspruch 14, Arzneimittel gemäß Anspruch 25, Diagnostikum gemäß Anspruch 26, Verwendung gemäß einem der Ansprüche 27, 29, 31 und/oder 32, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor (gegebenfalls gemäß Punkt c)) ein Expressionsvektor ist.
- 20 37. Vektor gemäß Anspruch 14, Arzneimittel gemäß Anspruch 25, Diagnostikum gemäß Anspruch 26, Verwendung gemäß einem der Ansprüche 27, 29, 31 und/oder 32, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor (gegebenfalls gemäß Punkt c)) abgeleitet ist von einem Virus, beispielsweise dem Adenovirus, Adenoassoziiertem Virus oder Herpesvirus und/oder er mindestens eine LTR-, Poly A-, Promotor- und/oder ORI-Sequenz enthält.
- 25 38. Protein oder Teilprotein gemäß einem der Ansprüche 15 - 17, Arzneimittel gemäß Anspruch 25, Diagnostikum gemäß Anspruch 26, Verwendung gemäß einem der Ansprüche 27, 29 und/oder 32, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein oder Teilprotein (gegebenfalls gemäß Punkt d)) posttranslational modifiziert wurde, es
- 30

insbesondere glykosiliert, phosphoryliert, amidiert, methyliert, acetyliert, ADP-ribosyliert, hydroxyliert, mit einem Membrananker versehen, gespalten oder verkürzt wurde.

- 5 39. Antikörper gemäß Anspruch 18, Arzneimittel gemäß Anspruch 25, Diagnostikum gemäß Anspruch 26, Verwendung gemäß einem der Ansprüche 27, 29 und/oder 32, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper (gegebenenfalls gemäß Punkt e)) ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper ist.
- 10 40. Zelle gemäß Anspruch 19, Arzneimittel gemäß Anspruch 25, Diagnostikum gemäß Anspruch 26, Verwendung gemäß einem der Ansprüche 27, 29, 31 und/oder 32, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Zelle (gegebenenfalls gemäß Punkt f)) um eine Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder eine immortalisierte oder native Säugetierzelle handelt.
- 15 41. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 23 oder 24, Arzneimittel gemäß Anspruch 25, Diagnostikum gemäß Anspruch 26, Verwendung gemäß einem der Ansprüche 27 und/oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Verbindung (gegebenenfalls gemäß Punkt g)) um eine niedermolekulare Verbindung handelt.
- 20 42. Arzneimittel gemäß Anspruch 25, Diagnostikum gemäß Anspruch 26, Verwendung gemäß einem der Ansprüche 27 und/oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß der genannte Wirkstoff gemäß Punkt h) ein niedermolekularer Wirkstoff ist.
- 25
- 30

### **Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Auffindung schmerzrelevanter Substanzen unter Verwendung der PIM-1- oder PIM-3-Kinase und die  
5 Verwendung dadurch identifizierter Verbindungen sowie Antikörper und Antisensenukleotiden gegen PIM-1- oder PIM-3-Kinase in Arzneimitteln und Diagnostika sowie in der Schmerztherapie.

10

Fig. 1a)

1	gaggaggccc	gagaggagtc	ggtggcagcg	gcggcggcgg	gaccggcagc	agcagcagca
61	gcagcagcag	caaccactag	cctcctgccc	cgcggcgttg	cgacgagccc	cacgagccgc
121	tcaccccgcc	gttctcagcg	ctgcccagcc	ccgctggcgc	gcctcccgcc	gcagtcccg
181	cagcgctca	gttgctctcc	gactcgccct	cggccttcgc	gcagcgacgc	acagccgcac
241	gcaccgcagc	acagcacagc	acagcccagg	catagcttcg	gcacagcccc	ggctccggct
301	cctgcggcag	ctcctctggc	acgtccctgc	gccgacattc	tggagggttg	atgctcttgt
361	ccaaaatcaa	ctcgcttgcc	cacctgcgcg	ccgcgccttg	caacgacctg	cacgccacca
421	agctggcgcc	cggcaaggag	aaggagcccc	tggagtcgca	gtaccagggtg	ggcccgtac
481	tgggcagcgg	cggcttcggc	tcggtctact	caggcatccg	cgtctccgac	aacttgccgg
541	tggccatcaa	acacgtggag	aaggaccgga	tttccgactg	gggagagctg	cctaattggca
601	ctcgagtgcc	catggaagtg	gtcctgctga	agaagggtgag	ctcgggtttc	tccggcgta
661	ttaggctcct	ggactggttc	gagaggcccc	acagtttcgt	cctgatcctg	gagaggcccc
721	agccggtgca	agatctcttc	gacttcatca	cggaaagggg	agccctgcaa	gaggagctgg
781	cccgcagctt	cttctggcag	gtgctggagg	ccgtgcggca	ctgccacaac	tgcggggtgc
841	tacaccgcga	catcaaggac	gaaaacatcc	ttatcgacct	caatcgcggc	gagctcaagc
901	tcatcgactt	cgggtcgggg	gcgctgctca	aggacaccgt	ctacacggac	ttcgatggga
961	cccagtgta	tagccctcca	gagtggatcc	gctaccatcg	ctaccatggc	aggtcggcgg
1021	cagtctggtc	cctggggatc	ctgctgtatg	atatgggtg	tggagatatt	ccttttcgagc
1081	atgacgaaga	gatcatcagg	ggccagggtt	tcttcaggca	gaggggtctc	tcagaatgtc
1141	agcatctcat	tagatgggtc	ttggccctga	gaccatcaga	tagggccaacc	ttcgaagaaa
1201	tccagaacca	tccatggatg	caagatgttc	tcctgcccc	ggaaaactgct	gagatccacc
1261	tccacagcct	gtcgccgggg	cccagcaaat	agcagccctt	ctggcaggtc	ctccctctc
1321	ttgtcagatg	cccaggggag	gggaagcttc	tgtctccagc	ttcccagagta	ccagtgcac
1381	gtctcgccaa	gcaggacagt	gcttgataca	ggaacaacat	ttacaactca	ttccagatcc
1441	caggccccctg	gaggctgcct	cccaacagtg	gggaagagt	actctccagg	ggtcctaggc
1501	ctcaactcct	cccatagata	ctctcttctt	ctcatagggtg	tccagcattg	ctggactctg
1561	aaatatcccc	gggggtgggg	gtgggggtgg	gcagaaccct	gccaatggaa	ctctttcttc
1621	atcatgagtt	ctgctgaatg	ccgcgatggg	tcaggtaggg	gggaaacagg	ttgggatggg
1681	ataggactag	cacattttta	gtccctgtca	cctcttccga	ctctttctga	gtgccttctg
1741	tggggactcc	ggctgtgctg	ggagaaatac	ttgaacttgc	ctcttttacc	tgtgcttct
1801	ccaaaaatct	gcctgggttt	tgttccctat	ttttctctcc	tgtcctccct	cacccctcc
1861	ttcatatgaa	aggtgccatg	gaagaggcta	cagggccaaa	cgtgagcca	cctgcccttt
1921	tttctgcctc	ctttagtaaa	actccgagt	aactggtctt	cctttttggt	ttttacttaa
1981	ctgtttcaaa	gccaagacct	cacacacaca	aaaaaatgca	caaaccaagc	aatcaacaga
2041	aaagctgtaa	atgtgtgtac	agttggcatg	gtagtataca	aaaagattgt	agtggatcta
2101	atttttaaga	aattttgcct	tttaagttatt	ttacctgttt	ttgtttcttg	ttttgaaaga
2161	tgcgcattct	aacctggagg	tcaatgttat	gtattttatt	atttatattat	ttggttccct
2221	tcctattcca	agcttccata	gctgctgccc	tagttttctt	tcctcctttc	ctcctctgac
2281	ttggggacct	tttgggggag	ggctgcgacg	cctgctctgt	ttgtgggggtg	acgggactca
2341	ggcgggacag	tgctgcagct	ccctggcttc	tgtggggccc	ctcacctact	taccaggtg
2401	ggtcccggct	ctgtgggtga	tgggaggggc	cattgctgac	tgtgtatata	ggataattat
2461	gaaacacagt	tctggatggt	gtgccttcca	gacctctct	ggggctgtgt	tttgagcagc
2521	aggtagcctg	ctggttttat	ctgagtga	tactgtacag	gggaataaaa	gagatcttat
2581	ttttttttta	tacttgcgtt	tgggaataaaa	accctttggc	ttt	

**Fig. 1b)**

```
1      mllskinsla hlraapcndl hatklapgke keplesqyqv gp1lgsggfg svysgirvsd
61     nlpvaikhve kdrisdwgel pngtrvpmev vllkkvssgf sgvirlldwf erpdsfvlil
121    erpepvqdlf dfitergalq eelarsffwq vleavrhchn cgvlhrdikd enilidlrg
181    elklidfgsg allkdtvytd fdgtrvyspp ewiryhryhg rsaavwslgi llydmvcgdi
241    pfehdeeirr gqvffrqrvs secqhlirwc lalrpsdrpt feeiqnhpwm qdvllpqeta
301    eihlhlslspg psk
```

Fig. 1c)

```
1   gggatgctct tgtccaagat caactccctg gccacactgc gcgcagcccc ttgcaacgac
61  ctgcacgcca acaagctggc gccgggcaaa gagaaggagc ccctggagtc gcagtaccag
121 gtggggccgc tgttgggcag cggtggttc ggctcggctt actcgggcat ccgcgtcgcc
181 gacaacttgc cggtgggcat caagcacgtg gagaaggacc ggatttccga ctggggggaa
241 ctgcccaacg gcacccgagt gcccatggaa gtggtcctgc tgaagaaggt gagctcgggc
301 ttctcgggcy tcattagact tctggactgg ttcgagaggc ccgatatgtt cgtgctgac
361 ctggagaggc ccgaaccgct gcaagacctc ttcgacttca tcaccgagcg aggagccctc
421 caggaggagc tggcccggag cttcttctgg cagggtgctgg aggcggtgcy gcattgccac
481 aactgcgggg ttctccaccg cgacatcaag gacgagaaca tcttaatcga cctgaaccgc
541 ggcgaaactca aactcatcga cttcgggtcg ggggcgctgc tcaaggacac agtctacacg
601 gactttgacg gaacccgagt gtacagtcct ccagagtgga ttcgctacca tcgctaccac
661 ggcaggtcgg ctgctgtttg gtccctgggg atcctgctct atgacatggt ctgcggagat
721 attccatttg agcacgacga agagatcgtc aagggccaaag tgtactttag gcaaagggtc
781 tcttcagaat gtcaacatct tattagatgg tgcctgtccc tgagaccatc ggaccggccc
841 tcctttgaag aaatccagaa ccatcctggt atgcaggatg ttctcctgcc ccaggccacc
901 gccgagattc atctgcacag cctgtcacca tcaccagca aatagcagcc attctgtcag
961 accctccagg gaagagagag cttgtctgct ggccctcaac aggaccctgc tctacgatgc
1021 agggacagaa atgacaactc attccaggct ccgggggtccc tggagcaacc tccctcaagg
1081 agaagagact agttcactcg tcttggaacc cgctttgccc ctcacagact cagtggcgctc
1141 cagtgtggct ggcgtccgca gagtcccggg tgttgggggg ggaggtggga gtgggtcaga
1201 gccctgtcat ggaactttag tcaccatgga gactgtgggt caccaagatg ggccagggta
1261 ggggaaaaac atttgggggg tgggattaa aactagcacc at
```

Fig. 1d)

```
1      mllskinsla hlraapcndl hanklapgke keplesqyqv gp1lgsggfg svysgirvad
61     nlpvaikhve kdrisdwgel pngtrvpmev vllkkvssgf sgvirlldwf erpdsfvlil
121    erpepvqdlf dfitergalq eelarsffwq vleavrhchn cgvlhrdikd enilidlrg
181    elklidfgsg allkdtvytd fdgtrvyspp ewiryhryhg rsaavwslgi llydmvcgdi
241    pfehdeeivk gqvyfrqrvs secqhlirwc lslrpsdrps feeiqnhpwm qdvllpqata
301    eihlslsps  psk
```



Fig. 1f)

```
1      mllskinsla hlrarpcndl hatklapgke keplesqyqv gpllgsggfg svysgirvad
61     nlpvaikhve kdrisdwgel pngtrvpmev vllkkvssdf sgvirlldwf erpdsfvlil
121    erpepvqdlf dfitergalq edlargffwq vleavrhchn cgvlhrdikd enilidlsrg
181    eiklidfgsg allkdtvytd fdgtrvyspp ewiryhryhg rsaavwslgi llydmvcgdi
241    pfehdeeik  gqvffrqtvs secqhlikwc lslrpsdrps feeirnhpwm qgdllpqaas
301    eihlhslspg ssk
```

**Fig. 2a)**



**Fig. 2 b)**



Fig. 2 c)

1	cgctcggcca	gctgccgtct	acgggcttcc	gcgcggccac	cgggcaactg	cgccgcgcgg
61	ctgccccact	gagcgctcgg	cctcggggcc	gtgggatccg	ccgcgctgtc	tgcggtcagg
121	aagaccgccc	tcccgcgtcc	gtgccggacg	ggtcagaggc	ggcgccgcac	gcgaggccac
181	ccgcgatgct	gctgtccaag	ttcggctccc	tggcgcacct	ctgcgggcct	ggcggcgtgg
241	accacctccc	agtgaagatc	ctacagccag	ccaaggcgga	caaggagagc	ttcgagaagg
301	tgtaccaggt	gggcgcctgt	ctcggcagcg	gcggcttcgg	cacggtctac	gcgggcagcc
361	gcatcgccga	cggactcccc	gtggctgtga	agcacgtggg	gaaggagcgg	gtgaccgagt
421	ggggcagtc	cggcggaatg	gccgtgcccc	tggagggtgg	gctgctgcgc	aagggtggcg
481	cggcgggcgg	cgcgcgcggc	gtcatccgcc	tgtctggactg	gttcgagcgg	cccagcggct
541	tcctgctggg	gctggagcga	cccagagcgg	cacaggacct	cttcgacttc	atcactgaac
601	gcggcgccct	ggacgagcct	ctggctcgtc	gcttcttcgc	gcaggtgtc	gccgctgtgc
661	ggcactgcca	caattgtggg	gtcgtgcacc	gcgacatcaa	ggacgagaac	ctgctggtgg
721	acttgcgctc	gggcgagctg	aagctcatcg	acttcggctc	gggcgcgggtg	ctcaaggaca
781	cggctctacac	tgactttgat	ggcaccctgt	tgtacagccc	cccagagtgg	atccggtatc
841	atcgatatca	cgggcggtct	gccactgtgt	ggtctctggg	tgtactgtc	tacgacatgg
901	tgtgtgggga	cattcccttt	gagcaggatg	aggagatctt	gcgcggcagg	ctctttttcc
961	ggaggagggt	ctccccagag	tgccagcagc	ttattgagtg	gtgtctctcc	ctgcggccct
1021	cagagaggcc	ctcgtgggac	caaattgctg	cccattccctg	gatgctgggg	acagagggca
1081	gcgttccaga	gaactgtgac	cttcggctct	gtgccctgga	tactgatgac	ggagccagta
1141	ccacttccag	cagtgaagac	ttgtgaggag	gaggaggggc	ctggactcca	cactgggggc
1201	ctgggctcag	cctagccagc	cctctcccag	aatgaacatt	ttctgcctgg	gatgtctcct
1261	gcaaaagcag	tgacctctga	cccctgggtga	cctttgctct	cggcaccggg	cctgtttcct
1321	ttgctttgag	tgcttttttg	aacgctgtc	cacagggcct	gggttttctt	gagctcttct
1381	gtccaaagat	ggctgcgggc	taagcaagg	cccgcctgcc	ctgggtggat	acttgaacct
1441	gagaccctac	cctgctgtc	catcttgcg	cagccttcct	gaccaagtgt	gtttgacatg
1501	gagcgcctc	tggtgcccac	ctccaaccct	ccagtctcct	ggtcttcgtc	tgggcatgtc
1561	tgcacaagca	atgcaacgct	gggccactgc	tgcccgcctg	cctccctggc	accgcacgca
1621	acgagcgtgc	cacggtctct	tatttatggg	gtgatcacc	tggagggcgc	ccctgccctg
1681	ctggggctat	ttattgttta	atttatgtgc	tgaggttact	tcctccaagc	aaccaccttc
1741	tccaggcccc	tgggggtgtc	aggaaagcca	agggtggccg	ttcagtccac	agacggcatc
1801	ctgggttcctg	cacctgcagt	aggtccctaa	ccccatgttt	gtgggaggag	gaatttgtac
1861	agtggcta	ttaaggggag	tgggagaccc	tgtcaccctg	ggcactctgc	gctggggagg
1921	gggtttta	tattgacctt	gtacagtctg	cttgctggct	ctgaaagctg	gggtggggga
1981	cagagtctca	agccctta	ttatttttagc	aactgtgttc	tgtgaccctg	gtgtgagtag
2041	gcatcagggg	tgggggtgta	taagttcaaa	agtgtaaat	gtctggagat	catatttttt
2101	atacaggtat	ttcaattaaa	tgttttggtat	tat		

Fig. 2 d)

```
1      mllskfgsla hlcgpggvdh lpvkilqpak adkesfekvy qvgavlgsgg fgtvyagsri
61     adglpvavkh vvkervtewg slggmavple vvlrkvgaa ggargvirll dwferpdgfl
121    lvlerpepaq dlfdfiterg aldeplarrf faqvlaavrh chncgvvhrd ikdenllvdl
181    rsgelklidf gsgavlkdtv ytddfgrvy sppewiryhr yhgrsatvws lgvllydmvc
241    gdipfeqdee ilrgrlffrr rvspecqli ewclslrpse rpsldqiaah pwmlgtegsv
301    pencdlrlca ldtddgastt sssesl
```

**Fig. 2e)**



**Fig. 2f)**



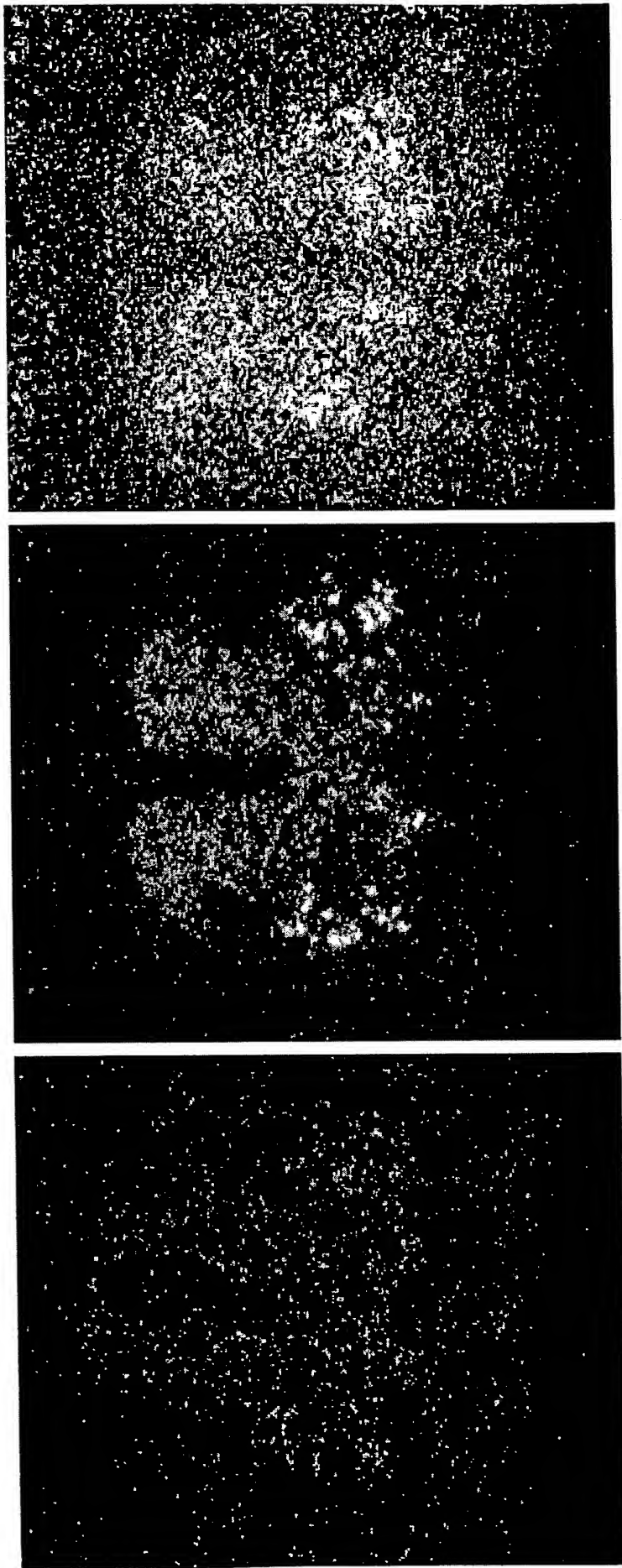


Fig. 3: mRNA-Expression der PIM-Kinasen im Lumbalmark der adulten Ratte

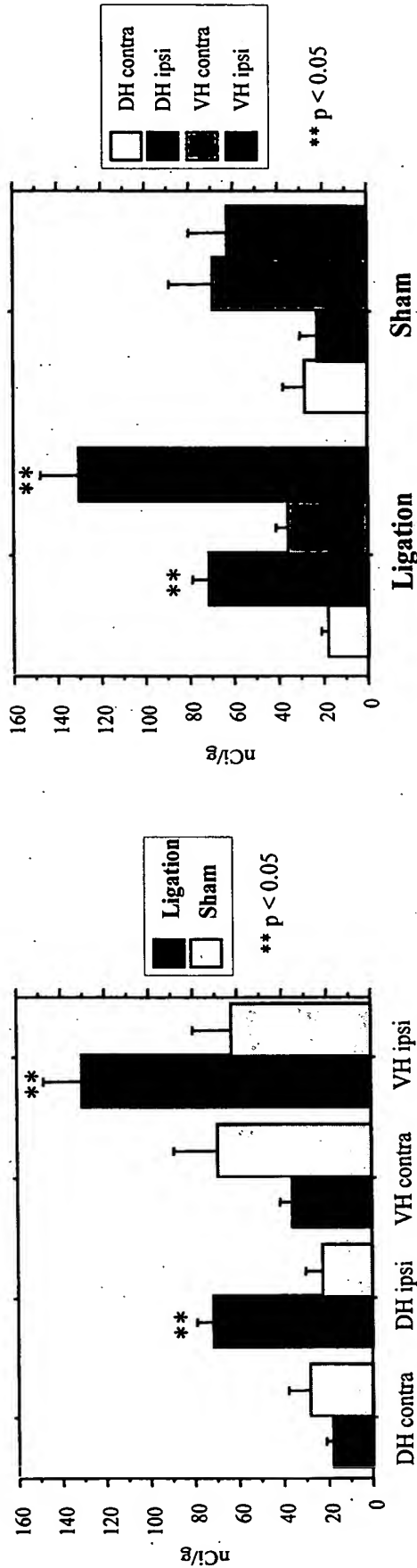




Fig. 4: Veränderungen der PIM-1 Genexpression im Rückenmark (L5) nach Ischiadicus-Ligatur (Bennett)

**Fig. 5: PIM-1 mRNA-Spiegel im Lumbalmark (L5) nach B nnett-Ligatur**

- Quantitative Auswertung der in situ-Hybridisierungsergebnisse -



Gruppe	Region	Messungen	Mittelwert (nCi/g)	SD	SEM
Ligation	DH contra	17	17,95	14,89	3,61
Ligation	DH ipsi	17	71,61	30,05	7,29
Ligation	VH contra	17	35,19	22,37	5,43
Ligation	VH ipsi	17	129,83	74,83	18,15
Sham	DH contra	9	27,64	29,68	9,89
Sham	DH ipsi	9	21,94	24,52	8,17
Sham	VH contra	9	69,30	57,77	19,26
Sham	VH ipsi	9	62,33	52,31	17,44

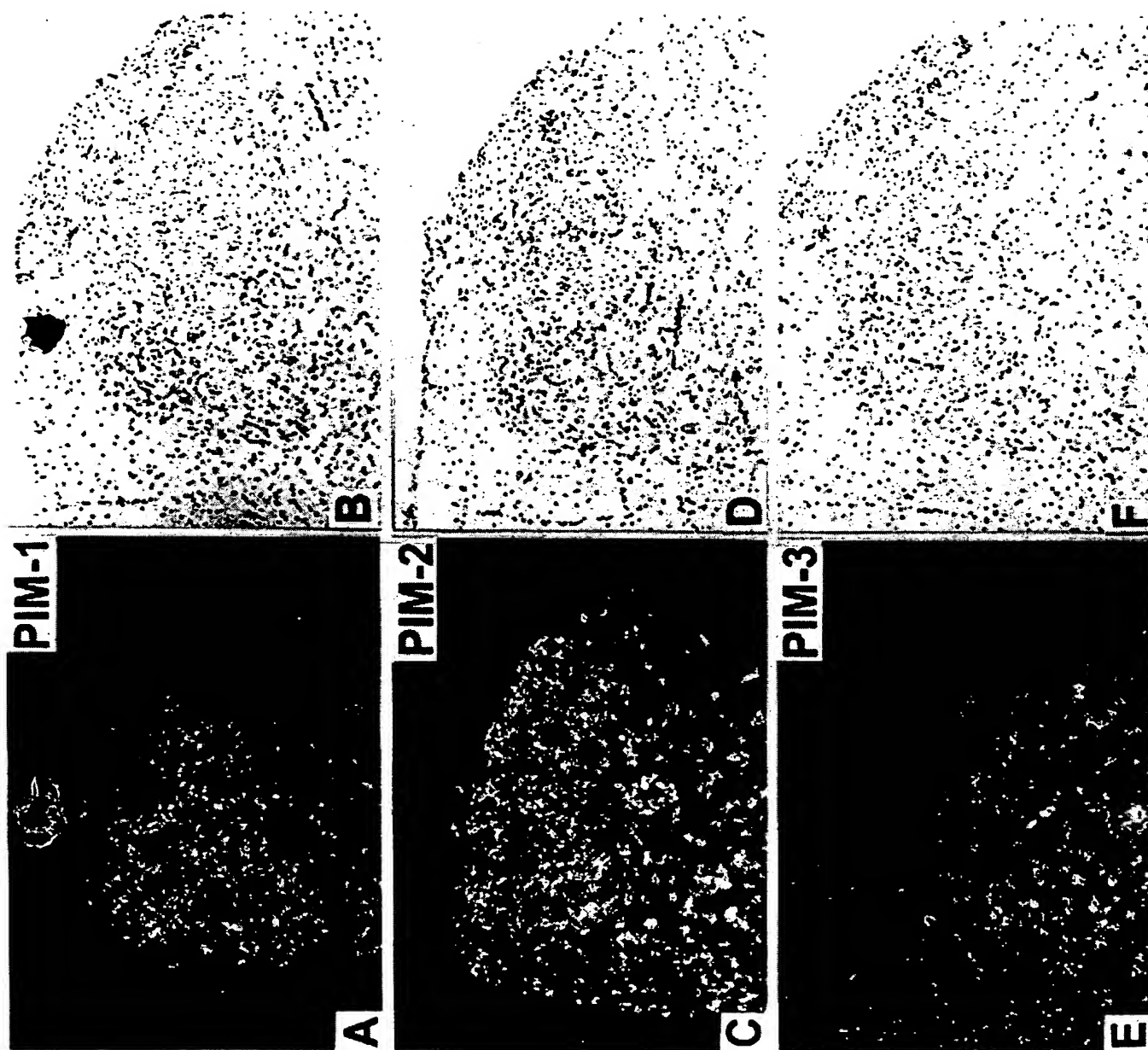


Fig. 6

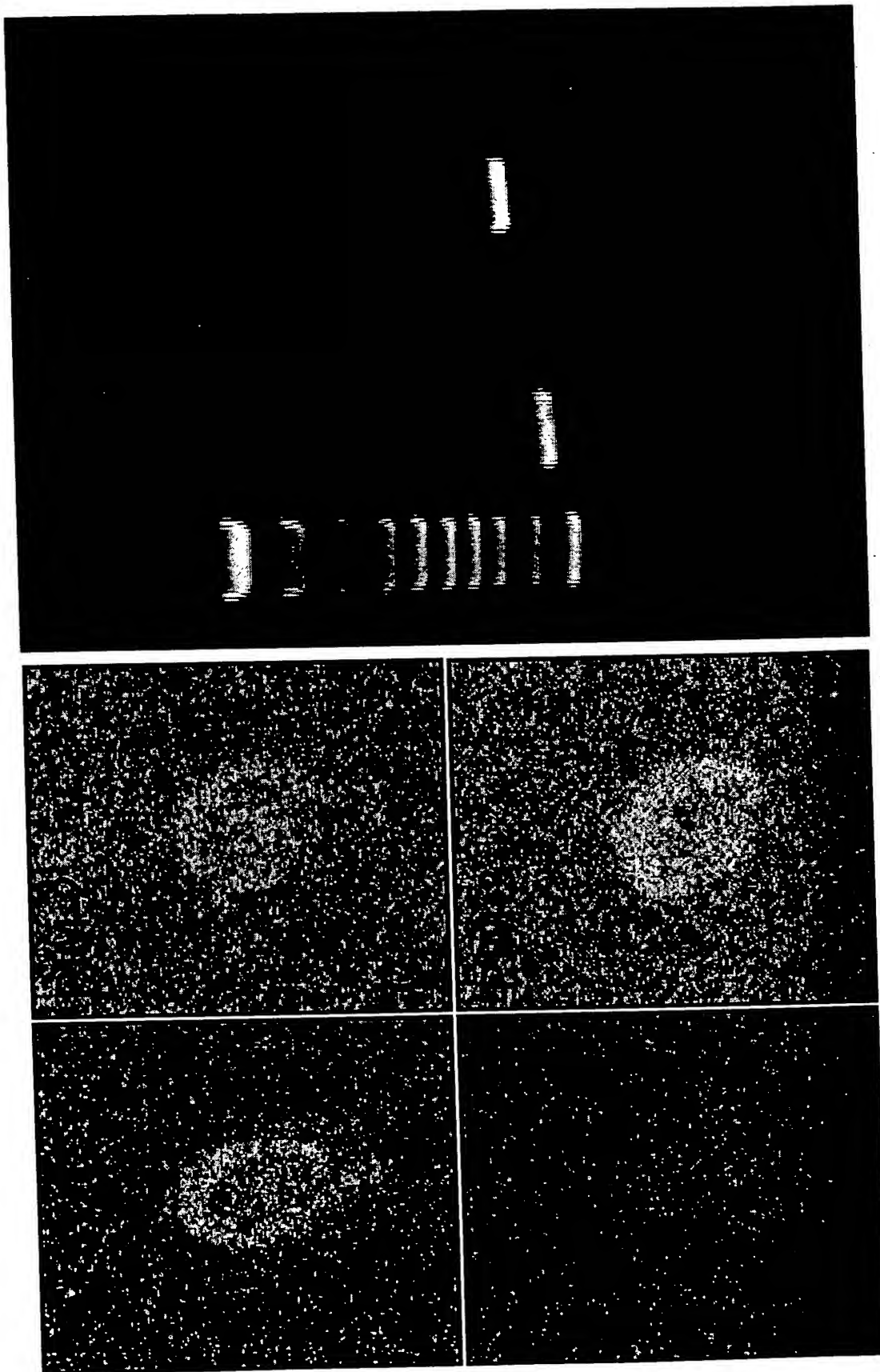


Fig. 7: mRNA-Expression der PIM-Kinasen im Spinalganglion

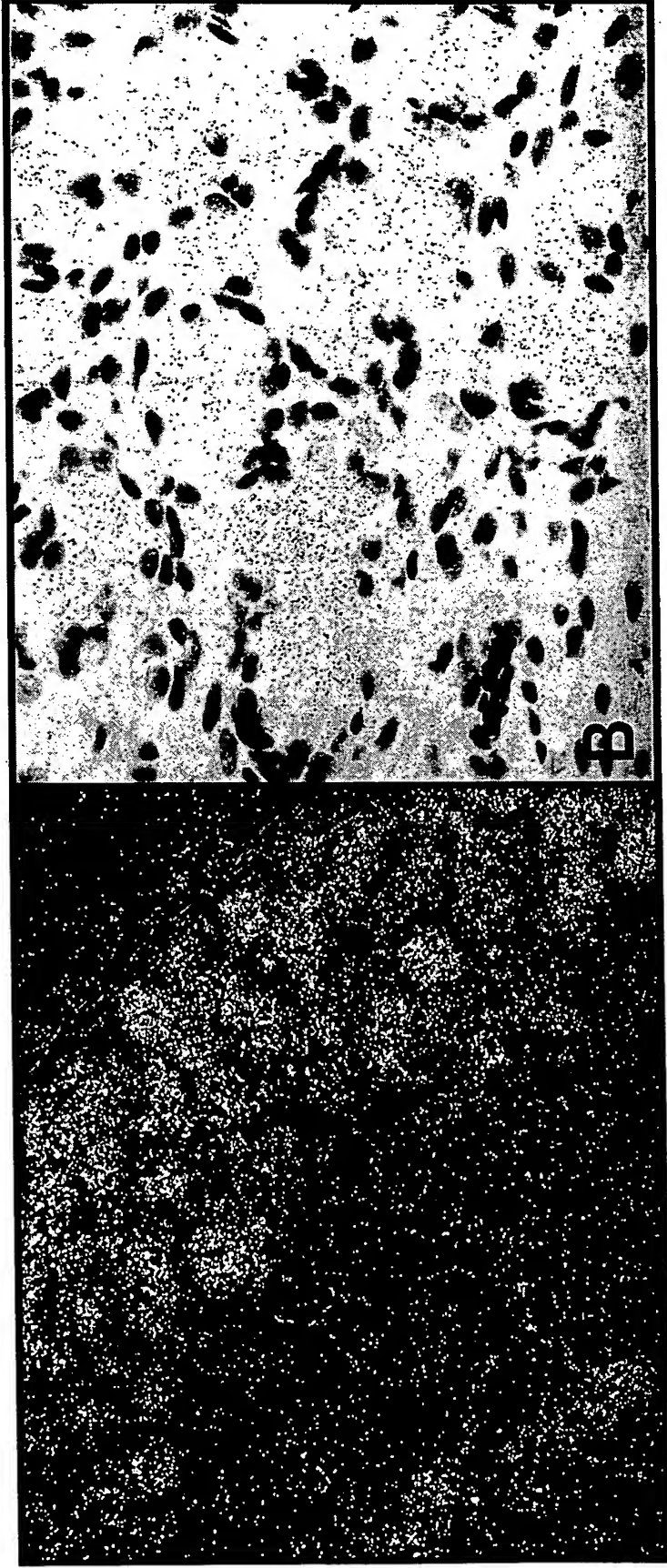
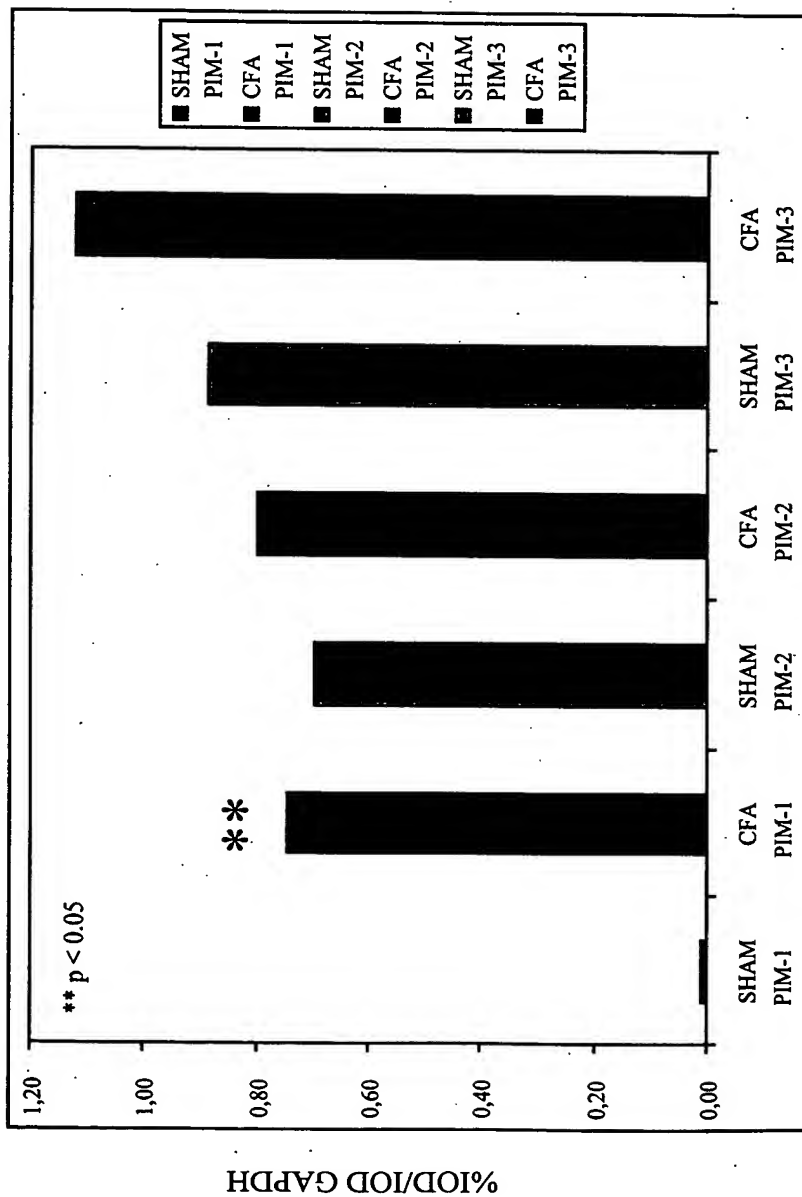


Fig. 8: Lokalisation der PIM-1 Genexpression im Spinalganglion (L6) der Ratte mit *in situ*-Hybridisierung

Fig. 9: Veränderungen der PIM-1, PIM-2 und PIM-3 mRNA-Spiegel  
im Spinalganglion L6 nach bilateraler CFA-Arthritis  
-Semi-quantitative RT-PCR Analyse -





Creation date: 11-17-2003  
Indexing Officer: NIBRAHIM - NEBIHA IBRAHIM  
Team: OIPEScanning  
Dossier: 10705524

Legal Date: 11-10-2003

No.	Doccode	Number of pages
1	TRNA	5
2	SPEC	44
3	CLM	4
4	ABST	1
5	DRW	16
6	OATH	8
7	WFEE	1
8	WFEE	1

Total number of pages: 80

Remarks:

Order of re-scan issued on .....